



AN DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR NEUROLOGIE AUS DER SEKTION FÜR NEUROIMMUNOLOGIE

(LEITER: PROF. DR. MED. UWE KLAUS ZETTL)

Untersuchung von microRNAs aus genetischen Risikoloci für Multiple Sklerose: Genotyp-abhängige Prozessierung, potentielle Zielgene und Expression in B-Zellen

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZINWISSENSCHAFTEN (DR. RER. HUM.)

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

NINA BOXBERGER, GEB. AM 22.12.1993 IN BERLIN

ROSTOCK, 2021

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003444

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. MED. UWE KLAUS ZETTL
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK
KLINIK UND POLIKLINIK FÜR NEUROLOGIE

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. MED. DR. RER. NAT. MARKUS KIPP
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK
INSTITUT FÜR ANATOMIE

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. MED. DR. RER. NAT. SVEN MEUTH
UNIVERSITÄTSKLINIKUM DÜSSELDORF
KLINIK FÜR NEUROLOGIE

DATUM DER VERTEIDIGUNG: 24.11.2021

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 MULTIPLE SKLEROSE	1
1.2 MICRORNAs	8
2. ZIELE DER STUDIE	15
3. SCHEMATISCHER ÜBERBLICK DER ARBEIT	17
4. MATERIALIEN UND METHODEN	18
4.1 MATERIALIEN	18
4.2 DATENBANKEN & BIOINFORMATISCHE TOOLS FÜR DIE RNA-ANALYSE	18
4.3 DATENBANKEN-BASIERTE SELEKTION VON MS-ASSOZIIERTEN MICRORNAs	19
4.4 KULTIVIERUNG VON HE LA-ZELLEN	21
4.5 PLASMIDPRÄPARATION	21
4.6 ANALYSE DER GENOTYP-ABHÄNGIGEN PROZESSIERUNG VON VORLÄUFER-MICRORNAs	25
4.7 MICRORNA ZIELGENANALYSE	28
4.8 BLUTPROBENSAMMLUNG	33
4.9 GENOTYPISIERUNG VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN	35
4.10 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG VON B-ZELLEN	37
4.11 MICRORNA-EXPRESSIONSANALYSE IN B-ZELLEN VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN	40
4.12 TRANSKRIPTOMANALYSE VON B-ZELLEN VON MS-PATIENTEN	43
4.13 INTEGRATIVE ANALYSE DER SNP-GENOTYPEN, MICRORNA-LEVEL UND TRANSKRIPTOMDATEN	43
5. ERGEBNISSE	45
5.1 GENETISCH MIT MS-ASSOZIIERTE MICRORNAs	45
5.2 GENOTYP-ABHÄNGIGE PROZESSIERUNG VON MICRORNAs	46
5.3 MICRORNA-ZIELGENE	49
5.4 AUSWAHL UND CHARAKTERISTIKA DER STUDIENKOHORTEN	53
5.5 GENOTYPEN VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN	55
5.6 PHÄNOTYPISIERUNG VON B-ZELLEN AUS DEM BLUT VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN	57
5.7 MICRORNA-EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE IN B-ZELLEN VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN	59
5.8 TRANSKRIPTOMPROFILE VON B-ZELLEN AUS MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN	63
5.9 ASSOZIATIONEN ZWISCHEN DEN SNP-GENOTYPEN, MICRORNA-EXPRESSIONS- UND TRANSKRIPTOMDATEN	65
5.10 ZUSAMMENFÜHRUNG DER ERGEBNISSE AUS DEN UNTERSUCHUNGEN <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i>	68

6. DISKUSSION	71
6.1 IDENTIFIZIERUNG VON GENETISCH MIT MS-ASSOZIIERTEN MICRORNAs	72
6.2 VON DER GENETISCHEN ASSOZIATION VON MICRORNAs ZU KAUSALEN PATHOMECHANISMEN BEI MS	75
6.3 ZELLTYP- UND KONTEXTSPEZIFISCHE EXPRESSION DER UNTERSUCHTEN MICRORNAs	80
6.4 DIE BEDEUTUNG VON MICRORNAs ALS BIOMARKER UND THERAPEUTISCHE ZIELMOLEKÜLE BEI MS	88
7. ZUSAMMENFASSUNG	91
8. LITERATURVERZEICHNIS	93
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
10. TABELLENVERZEICHNIS	119
11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120
12. ANHANG	123
12.1 MATERIALIEN	123
12.2 GATING-STRATEGIE FÜR DIE B-ZELL-PHÄNOTYPISIERUNG	130
12.3 WEITERE GENETISCH MIT MS ASSOZIIERTE MICRORNAs	131
12.4 PRIORISIERTE ZIELGENE	132
12.5 TRANSKRIPTLEVEL VON AN DER MICRORNA-BIOGENESE BETEILIGTEN GENEN	134
12.6 TRANSKRIPTLEVEL VON ZIELGENEN VON HSA-MIR-199A-1	135
13. DANKSAGUNG	137
14. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	138
15. LEBENSLAUF	139

1. EINLEITUNG

1.1 MULTIPLE SKLEROSE

Erste wissenschaftliche Beschreibungen des klinisch heterogenen Krankheitsbildes Multiple Sklerose (MS) liegen über 150 Jahre zurück [1].

Epidemiologie

Die MS ist eine immunmedierte, chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit einer neurodegenerativen Komponente [2, 3]. Weltweit sind etwa 2,8 Millionen Menschen betroffen [4]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter für MS liegt bei 32 Jahren. Die Erkrankung betrifft Frauen etwa doppelt bis dreimal so häufig wie Männer. Die Prävalenz dieser neurodegenerativen Erkrankung des ZNS variiert von fünf bis neun Betroffenen pro 100.000 Einwohnern in der Westpazifik-Region und in Afrika bis hin zu über 200 pro 100.000 in Mitteleuropa und Nordamerika [4, 5]. Die globale Prävalenz der MS steigt stetig an; zwischen 1990 und 2016 um 10,4 % [6]. In Deutschland waren im Jahr 2015 mehr als 220.000 gesetzlich krankenversicherte Menschen an MS erkrankt [7].

Immunpathologie

Die Ätiologie der MS ist bislang unklar. Wie neuropathologische Studien zeigten, spielt das Immunsystem eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der MS. Immunzellen infiltrieren das ZNS über die Blut-Hirn-Schranke, führen zur Demyelinisierung von Nervenzellen, zur Aktivierung von Gliazellen in Form einer vermehrten Gliafaserbildung (Gliose) und vermitteln eine axonale Schädigung von Nervenzellen und einen Verlust von Synapsen, was zu einer Störung der neuronalen Signalübertragung führt [8, 9]. Aus dieser Schädigung entstehende klinische Symptome können sich vor allem dadurch zurückbilden, dass gesunde Nervenzellen die Funktionen von irreversibel geschädigten Nervenzellen übernehmen (Neuroplastizität) [10]. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung akkumulieren die neuronalen Schäden jedoch und können letztendlich nicht mehr ausreichend durch gesundes Gewebe kompensiert werden, sodass sich die Symptome verschlimmern. Der genaue Auslöser, der die Dysregulation der Immunreaktion verursacht, und ob dieser aus der Peripherie oder dem ZNS stammt, ist nicht bekannt und könnte sich zwischen der schubförmig remittierenden MS (*relapsing-remitting MS; RRMS*) und den progredienten Formen unterscheiden [8]. Eine wichtige Rolle spielen jedoch die individuelle genetische Prädisposition, epigenetische Faktoren [11], das Microbiom [12, 13] und verschiedene Umwelteinflüsse. Zu den am besten beschriebenen Umwelt- und Lebensstilfaktoren, die MS begünstigen, zählen eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV), das Rauchen und ein hoher Body-Mass-Index [14, 15].

Zellen des angeborenen Immunsystems (dendritische Zellen, Makrophagen, Microglia) und hauptsächlich Zellen der erworbenen Immunantwort (B-Zellen, CD4⁺ und insbesondere CD8⁺ T-Zellen) sind an der Pathogenese der MS beteiligt [16]. Sowohl T-Zellen als auch B-Zellen sind in Läsionen des ZNS von MS-Patienten zu finden [8]. Bei MS liegt eine Störung der Immuntoleranz vor, bei der T-Zellen neuronale Antigene erkennen [17]. Welche Antigene eine Rolle als Auslöser für MS spielen ist jedoch nicht geklärt. Über Jahrzehnte befanden sich die T-Zellen als Vermittler der inflammatorischen Demyelinisierung im Mittelpunkt der MS-Forschung. In 2008 beschrieben Hauser *et al.* [18] die positive Wirkung von dem B-Zell-depletierenden Wirkstoff Rituximab auf den Krankheitsverlauf der RRMS, wodurch sich der Fokus auf die Beteiligung von B-Zellen bei der MS verschob. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung von B-Zellen von MS-Patienten, weshalb die Relevanz von B-Zellen bei MS im Folgenden weiter beschrieben wird. Aus B-Zellen differenzierte Plasmablasten und Plasmazellen produzieren Antikörper. Oligoklonale Immunglobuline im Liquor sind als wichtige Biomarker mit der MS-Manifestation und mit einer schlechteren Prognose assoziiert [19]. Weiterhin tragen B-Zellen als Regulatoren der Immunantwort mittels T-Zell-Aktivierung durch Antigenpräsentation und durch die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen und Chemokinen, auch im Gehirn, zur MS-Pathogenese bei [20]. Außerdem können B-Zellen lösliche toxische Faktoren produzieren, welche zur Schädigung von Oligodendrozyten und Neuronen beitragen [21, 22]. Somit schaffen B-Zellen ein proinflammatorisches Milieu, welches wiederum andere Immunzellen zur Differenzierung und Einwanderung ins ZNS anregt. Auch sind es B-Zellen, die von EBV infiziert werden und ein Reservoir für das Virus bilden [23]. Obwohl MS als Erkrankung des ZNS gilt, findet sich auch für die peripheren B-Zellen ein aberrant proinflammatorisches Profil [22]. Die Entwicklung weiterer wirksamer B-Zell-depletierender Therapien in den letzten Jahren hat die wichtige Rolle von B-Zellen bei MS bestätigt [24, 25].

Genetik

Die Entwicklung der MS ist auch von prädisponierenden genetischen Faktoren abhängig, wie in Zwillingstudien gezeigt werden konnte. Ist ein Zwilling an MS erkrankt, so ist in bis zu 30 % der Fälle auch der andere monozygote Zwilling betroffen [26, 27]. Zu den genetischen Risikofaktoren zählen als häufigster Typ Einzelnukleotidpolymorphismen (*single-nucleotide polymorphisms*; SNPs) [28]. SNPs beschreiben Variationen einzelner Basenpaare an einer bestimmten Stelle des Genoms [29]. So kann z.B. eine Person die Base C und eine andere Person die Base T an einem bestimmten Genlocus eines Chromosoms haben. Das wäre dann ein bi-allelischer SNP mit den möglichen Ausprägungen C oder T. Tri- und tetra-allelische SNPs sind selten. Ein Individuum kann aufgrund des diploiden Chromosomensatzes in Bezug auf einen SNP hetero- oder homozygot sein. Heterozygot bezeichnet

dabei, dass das Individuum auf dem einen Chromosom eines Chromosomenpaares das eine Allel und auf dem anderen homologen Chromosom ein anderes Allel des SNPs trägt. Liegt auf beiden Chromosomen z.B. die Base C vor, so ist das Individuum homozygot für dieses Allel. Der Genotyp eines Menschen bezeichnet dabei die Ausprägungen aller genetischen Varianten bei diesem Menschen, kann sich aber auch auf die Beschreibung eines bestimmten SNPs beziehen. Der Begriff Haplotyp hingegen bezieht sich auf die Ausprägung aller genetischen Varianten in einem DNA-Sequenzabschnitt auf einem Chromosom [30]. Ein Individuum unterscheidet sich aufgrund von SNPs zu einem anderen Individuum in etwa jeder 1000ten Base [31]. Laut der Datenbank dbSNP 154 [28] sind im humanen Genom – mit einer Länge von etwa 3,3 Milliarden Basenpaaren (bp) – insgesamt ca. 700 Millionen SNPs, die in kodierenden oder nicht-kodierenden Regionen liegen können, bekannt. Während für die meisten Ausprägungen von SNPs keine Auswirkungen auf die Genexpression bekannt sind, können die Allele auch die Expressionslevel von Transkripten beeinflussen (sogenannte eQTL; *expression quantitative trait loci*) [32–34].

Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) können Allelausprägungen von SNPs identifiziert werden, die bei Patienten mit einer bestimmten Krankheit häufiger auftreten als bei Kontrollen. Für die untersuchten SNPs werden *odds ratios* (OR) berechnet. Das OR ist ein statistisches Maß, das verwendet werden kann, um zu quantifizieren, wie stark ein Allel eines SNPs mit der Entwicklung der Krankheit assoziiert ist. Im Rahmen von GWAS und Metaanalysen zur Assoziation von SNPs mit der MS wurden vorrangig SNPs mit einer Allelfrequenz des selteneren Allels (*minor allele frequency*, MAF) von mindestens 1 % in der Bevölkerung betrachtet [35, 36]. In der jüngsten GWAS [36] wurden ca. 500.000 SNPs, die repräsentativ für die jeweils umliegenden SNPs sind, genotypisiert. Darüber hinaus kann es also weitere SNPs mit einer geringeren MAF geben, die mit MS assoziiert sind. Es wird davon ausgegangen, dass seltene Varianten in genkodierenden Sequenzen etwa 5 % der Vererblichkeit der MS ausmachen [37]. Genetische Varianten werden in der Regel zusammen mit umliegenden Varianten vererbt, mit denen sie in Haplotyp-Blöcken liegen, welche sich durch bevorzugte Rekombinationsstellen im Genom ergeben. Allele von zwei nahe beieinander liegenden SNPs sind im Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD), wenn sie tendentiell zusammen vererbt werden [38]. Ein *lead SNP* ist derjenige SNP einer genetischen Region, der bei der GWAS den kleinsten Signifikanzwert ergab. SNPs, die nahe MS-assoziierten *lead SNPs* liegen und mit ihnen in LD sind, sind somit genauso mit MS assoziiert und unter diesen verbergen sich mutmaßlich die kausalen SNPs eines jeweiligen Risikolocus. Veränderungen auf Genom-Ebene können sich auf epigenetische Prozesse, das Transkriptom, Proteom und Metabolom auswirken (s. Abbildung 1).

In GWAS und Metaanalysen wurden bislang 233 *lead* SNPs identifiziert, die mit einem signifikant erhöhten Risiko an MS zu erkranken assoziiert sind [36]. Für die meisten dieser SNPs liegen die ORs bei weniger als 2,0 [35–37, 39]. Viele dieser über 200 genetischen Varianten befinden sich in der Nähe von Genen, die an immunologischen Prozessen beteiligt sind, wie NF- κ B, CD40 und VCAM1. Bestimmte Allele von humanen Leukozytenantigenen (HLA)-Klasse II (Rezeptoren auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen), welche an der Aktivierung von T-Helfer-Zellen beteiligt sind, tragen am stärksten zum Risiko bei, an MS zu erkranken [40]. Beispielsweise wurde für das A-Allel von rs3135388, das mit HLA-DRB1*15:01 korreliert, bei heterozygoten Trägern ein OR von 2,09 und für homozygote Träger ein OR von 4,37 für die MS-Suszeptibilität beschrieben [41]. Eine andere HLA-Variante, HLA-A*02:01, die mit rs2844821G korreliert, gilt als protektiv für MS (OR = 0,70) [42].

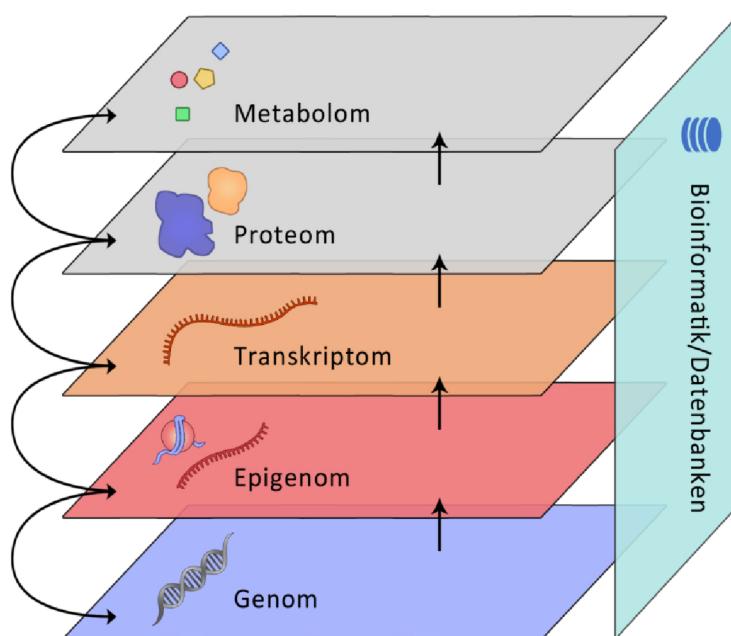


Abbildung 1: Ebenen für die Untersuchung von molekulärbiologischen und biochemischen Prozessen. Das Genom kodiert für die Gesamtheit der Transkripte eines Organismus. Mechanismen auf epigenetischer Ebene, wie Histonmodifikationen und die Regulation durch microRNAs, beeinflussen die genaue Komposition des Transkriptoms. Durch die Translation von Transkripten werden Proteine gebildet, welche wiederum Metabolite verstoffwechseln. Alle genannten Ebenen stehen in Wechselwirkung miteinander und so können z.B. Proteine Einfluss auf das Genom nehmen. Auch innerhalb der Ebenen interagieren die Moleküle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Prozesse auf Genom-, Epigenom- und Transkriptomebene molekulärbiologisch untersucht und die Erkenntnisse durch bioinformatische und Datenbanken-gestützte Analysen integriert.

Bislang wurden nur zu einigen wenigen Risikoloci, wie IL7R und IL2R [43], funktionelle Analysen zur Aufklärung der kausalen SNPs, die zur Dysregulation biologischer Prozesse bei MS und zu verschiedenen klinischen Verläufen der Krankheit führen, durchgeführt [44]. Die funktionellen und pathophysiologischen Implikationen der Risikovarianten müssen untersucht werden, um die Ätiopathologie der MS zu verstehen. Die Identifizierung von kausalen SNPs nach GWAS wird jedoch

unter anderem dadurch erschwert, dass sich die meisten Krankheits-assoziierten Varianten in nicht-kodierenden Regionen des Genoms befinden [45]. Außerdem wird davon ausgegangen, dass kausale Mechanismen oft auf moderaten und zelltypspezifischen regulatorischen Effekten auf Transkriptomebene beruhen [45].

Verlauf

Drei Krankheitsverläufe der MS werden unterschieden: die RRMS, die primär progrediente MS (PPMS) und die sekundär progrediente MS (SPMS) [46]. Die initial häufigste Verlaufsform, mit einem Anteil von etwa 85 %, ist die RRMS, welche durch wiederkehrende Krankheitsschübe, die durch ZNS-Läsionen bedingt werden, charakterisiert ist [8, 47]. Zwischen den Episoden können sich die Symptome zurückbilden [10]. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung verschlimmern sich die Symptome jedoch. Der Schweregrad der Behinderung durch MS wird üblicherweise mithilfe der Skala EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) bewertet [48].

Innerhalb von 25 Jahren nach der Diagnose konvertieren 80 % der RRMS-Patienten zur SPMS [8]. In 10 % – 15 % aller MS-Fälle wird die Erstdiagnose PPMS gestellt [8, 49]. Die progredienten Formen sind durch eine fortschreitende Verschlimmerung der neurologischen Beeinträchtigungen ohne wesentliche Remission im Verlauf der Erkrankung gekennzeichnet [8, 46]. Die Verlaufsformen der MS werden außerdem nach der Krankheitsaktivität kategorisiert: Eine aktive MS liegt vor, wenn neue Schübe und/oder ZNS-Läsionen nachgewiesen werden. Ist das nicht der Fall, wird die MS als stumm oder nicht-aktiv kategorisiert [46]. Einige soziodemographische und klinische Merkmale sowie Laborparameter, welche für die Prognose der Krankheitsprogression nützlich sind, wurden beschrieben [50]. Eine genaue Vorhersage über den individuellen Verlauf der MS zu treffen, gestaltet sich dennoch schwierig. Als chronische Erkrankung schreitet die MS bis zum Tode über Jahrzehnte fort und führt neben körperlichen und kognitiven Behinderungen der Betroffenen meistens auch zur Frühberentung der Patienten und ist damit von großer sozioökonomischer Bedeutung [51].

Diagnose

Die Diagnose der klinisch heterogenen Erkrankung MS beruht auf der klinischen Manifestation, auf mittels Magnetresonanztomographie (MRT) gefundenen Läsionen im ZNS, dem Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor, welche auf eine intrathekale Antikörpersynthese nach B-Zell-Aktivierung hindeuten und der Differentialdiagnose zum Ausschluss anderer Ursachen, wie Migräne, einer Vaskulopathie oder einer Neuroborreliose. Klinische Manifestationen der MS können unter anderem die motorischen, sensorischen, optischen und autonomen Systeme betreffen, z.B. als vorübergehender Sehverlust, Lähmungserscheinung und kognitive Funktionsstörung [52, 53].

Krankheitsschübe sind als Symptome definiert, welche länger als 24 Stunden anhalten, ohne eine begleitende Infektion auftreten und sich zurückbilden können [54, 55]. Laut den McDonald-Kriterien von 2017 werden für die Diagnose zeitlich und räumlich disseminiert auftretende Läsionen im ZNS, also mehrere Bereiche, die zu verschiedenen Zeitpunkten betroffen waren, gefordert [54]. Gibt es nur Anzeichen eines Krankheitsschubes ohne zeitliche Dissemination, spricht man von einem klinisch-isolierten Syndrom [46, 56]. Trotz der etablierten McDonald-Kriterien wird in Studien von Fehldiagnosen, die über Jahre als MS eingeordnet und entsprechend therapiert wurden, berichtet [57]. Von den falsch diagnostizierten Patienten behielten 50 % diese falsche MS-Diagnose über drei oder mehr Jahre lang, ehe die Fehldiagnose als solche erkannt wurde [58]. Gründe hierfür liegen in der klinischen Heterogenität und dem Fehlen von spezifischen MS-Biomarkern. Bislang konnte kein Immunmarker im Blut mit einer hohen Sensitivität und Spezifität für die Diagnose der MS gefunden werden. Durch die verbreitete Anwendung von *high-throughput* Sequenziertechnologien ergeben sich jedoch neue Möglichkeiten für die Entdeckung von Biomarkern für MS, insbesondere im Bereich von nicht-Protein-kodierenden RNAs [59].

Therapie

Die Therapie der MS richtet sich nach der Verlaufsform und basiert auf vier Säulen: Der verlaufsmodifizierenden Therapie (*disease modifying therapy*; DMT), der symptomatischen Behandlung, Coping- und sozialmedizinischen Maßnahmen [60]. Die DMTs zielen dabei auf eine Reduzierung der Bildung von ZNS-Läsionen, auf eine Verringerung der Schubrate und der Behinderungsprogression ab [61]. Die symptomatische Behandlung der MS umfasst Physio- und Ergotherapie, Logopädie und die psychologische Behandlung, Rehabilitationsmaßnahmen und medikamentöse Behandlung, z.B. mit Antispastika [62]. Zusätzlich erfolgt bei den schubförmigen Verläufen situationsabhängig die Schubtherapie [60]. Zur akuten Therapie von Krankheitsschüben werden in erster Linie Glukokortikosteroide, welche die Entzündungsreaktion verringern, und in zweiter Linie Verfahren zur Plasmaseparation eingesetzt. Je früher und je besser ein Schub behandelt wird, desto höher ist der therapeutische Erfolg und desto eher bilden sich akute Symptome wieder zurück.

Die Empfehlungen zur immunmodulatorischen Therapie der MS unterliegen einem dynamischen Prozess und sind gegenwärtig im deutschen Sprachraum in drei Publikationen veröffentlicht: Der S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie von der MS der Deutschen Gesellschaft für Neurologie [62], dem Positionspapier zur verlaufsmodifizierenden Therapie der MS von der MS Therapie Konsensus Gruppe [63] und dem Qualitätshandbuch MS/NMOSD des Krankheitsbezogenen Kompetenznetzes MS [64]. In Abbildung 2 ist die Therapie der RRMS, SPMS und PPMS dargestellt.

RRMS	SPMS	PPMS
(Hoch-)aktiv Erst- und Zweitlinientherapie	Mit Schüben	Mit klinischer Aktivität/ MRT-Aktivität
<ul style="list-style-type: none"> - Natalizumab - S1P-Modulatoren (Fingolimod, Ozanimod, Ponesimod) <p><i>Immunrekonstituierende Therapien</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Alemtuzumab - Cladribin - Ocrelizumab - Ofatumumab 	<ul style="list-style-type: none"> - Interferon-β-1b s.c. - Ponesimod - Siponimod - Mitoxantron^a <p><i>Immunrekonstituierende Therapien</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Cladribin - Ocrelizumab - Ofatumumab 	<p><i>Immunrekonstituierende Therapie</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Ocrelizumab
Mild/moderat	Ohne Schübe/mit MRT-Aktivität	
<ul style="list-style-type: none"> - Dimethylfumarat - Glatirameracetat - Interferone - Teriflunomid - Azathioprin^a 	<ul style="list-style-type: none"> - Siponimod 	

Abbildung 2: Therapie der Multiplen Sklerose nach Verlaufsform. Die verlaufsmodifizierenden Therapeutika, die für die Behandlung der verschiedenen MS-Formen empfohlen werden, sind angegeben. Für die Therapie der RRMS stehen diverse Immunmodulatoren zur Verfügung. Als erste immunrekonstituierende Therapie wurde Alemtuzumab 2013 bei MS zugelassen [65]. Ocrelizumab [66] und Cladribin [67] folgten 2017. Anfang 2021 wurde mit Ofatumumab ein weiterer, anti-CD20-Antikörper, erstmals zur subcutanen Applikation, von der europäischen Arzneimittelagentur für die MS zugelassen [22]. Für die Behandlung der SPMS mit Schüben werden unter anderem IFN- β -Präparate verwendet. Im Jahr 2017 wurde mit Ocrelizumab das bislang einzige Medikament für die Behandlung der aktiven PPMS zugelassen. Die Möglichkeiten für die wirksame Behandlung der progredienten Verlaufsformen sind jedoch nach wie vor begrenzt. ^a = Wirkstoffe, die als 2. Wahl eingesetzt werden können; MRT = Magnetresonanztomographie; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubförmig remittierende MS; s.c. = Subcutan; SPMS = Sekundär progrediente MS.

Nachfolgend wird auf die Therapeutika, die für das Studiendesign der vorliegenden Arbeit relevant sind, genauer eingegangen: Als Basistherapeutika für die RRMS stehen diverse Immunmodulatoren, welche proinflammatorische Prozesse zu Gunsten von antiinflammatorischen Effekten verringern, zur Verfügung. Dazu zählt Natalizumab, ein gegen VLA-4 gerichteter Inhibitor der Zellmigration, der unter anderem die Migration von Immunzellen ins ZNS hemmt [68].

Alemtuzumab, ein gegen CD52 gerichteter monoklonaler Antikörper, und Cladribin, ein Purin-Nukleosid-Analogon, gehören zu den immunrekonstituierenden Therapien (IRTs), einer Untergruppe der DMTs [69]. Das Ziel im Einsatz von IRTs ist es, durch intensive kurzfristige Immunsuppression oder Immunzelldepletion ein pathogenes adaptives Immunrepertoire zu eliminieren und ein gesundes Immunsystem wiederherzustellen. IRTs sind hochwirksam und in einigen MS-Patienten konnte eine anhaltende Remission über zehn Jahre gezeigt werden [69]. Alemtuzumab und Cladribin werden für

die Behandlung der MS gemäß den Fachinformationen des Fachinfo-Service der Roten Liste in jährlichen Behandlungszyklen verabreicht (Stand 24. Mai 2021). Im Unterschied dazu müssen alle anderen DMTs, die keine IRTs sind, regelmäßig (z.B. täglich oder wöchentlich) appliziert werden und durch sie wird keine langfristige Remission erreicht [70]. Die Behandlung mit Alemtuzumab führt zur Depletion von im Blut zirkulierenden B-Zellen als auch T-Zellen. Die Therapie mit Cladribin vermittelt vorrangig die Depletion von zirkulierenden B-Zellen und hat einen moderaten Effekt auf T-Zellen [69]. B-Zellen in sekundären lymphoiden Organen und auch B-Zell-Vorläufer im Knochenmark sowie Plasmablasten und Plasmazellen sind nur bedingt betroffen [24, 25]. Durch die Interaktion von B-Zellen mit vielen anderen Zelltypen wirkt sich die B-Zell-Depletion auch auf andere Zellen aus und führt unter anderem zu einer verminderten proinflammatorischen Antwort von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [22]. Die B-Zellpopulation im Blut erholt sich drei Monate nach Alemtuzumab-Gabe und steigt nach zwölf Monaten auf ca. 165 % des Baseline-Werts an [71]. Ein Jahr nach Cladribin-Verabreichung repopulieren die B-Zellen langsam auf 70 % – 80 % des Baseline-Werts [25, 72]. Für die Rekonstitution des Immunsystems durch die Behandlung konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sich das wiederhergestellte B-Zell-Profil funktionell von dem proinflammatorischen Profil der B-Zellen vor Beginn der Therapie unterscheidet [69].

1.2 MICRORNAs

Eigenschaften von microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von etwa 22 nt, die als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression wirken, indem sie an komplementäre Sequenzen in Zieltranskripten binden [73]. Unter den nicht-Protein-kodierenden RNAs gehören miRNAs zu den am besten beschriebenen Molekülen im Zusammenhang mit Erkrankungen [59, 74]. Rund 60 % der humanen messenger RNAs (mRNAs) Protein-kodierender Gene werden von miRNAs reguliert [75]. Darüber hinaus können nicht-Protein-kodierende Transkripte, wie andere miRNAs, kleine interferierende RNAs (siRNAs), lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) oder zirkuläre RNAs (circRNA), Ziele von miRNAs sein [76–79]. Für verschiedene miRNAs wurde gezeigt, dass ihre Dysregulation zu pathologischen Veränderungen in der Entwicklung und Krankheits-assoziierten Phänotypen führt, wie einer veränderten Anfälligkeit für Infektionen und zu autoimmunvermittelten Krankheiten [73, 80]. In der aktuellen Version 22 der Datenbank miRBase sind 2.883 bekannte humane reife miRNAs aufgelistet [81]. Etwa die Hälfte der menschlichen miRNAs ist in der Klasse der Säugetiere konserviert, während die andere Hälfte primaten- oder humanspezifisch ist [82].

Biogenese von microRNAs und IsomiRs

Im Genom liegen miRNA-kodierende Sequenzen mit einer Länge von ca. 80 nt, welche die Sequenzen für reife miRNAs beinhalten. Etwa die Hälfte aller zurzeit bekannten miRNAs stammt aus intragenischen Regionen, insbesondere aus Introns [83]. Die Gene, die in den gleichen Loci wie die miRNA-kodierenden Sequenzen liegen, werden *host Gene* genannt. Während die *host Gene* und die entsprechenden miRNAs zunächst gemeinsame Primärtranskripte bilden, werden die Protein- und die miRNA-Biogenese unabhängig voneinander reguliert, sodass eine Entkopplung der Expression der *host Gene* und der miRNAs möglich ist [84–86]. Die andere Hälfte der miRNAs wird in intergenischen Regionen kodiert und ihre Expression wird unabhängig von anderen Genen reguliert. Die Biogenese von reifen miRNAs wird in den kanonischen Weg und in mehrere nicht-kanonische Wege unterteilt (s. Abbildung 3) [87].

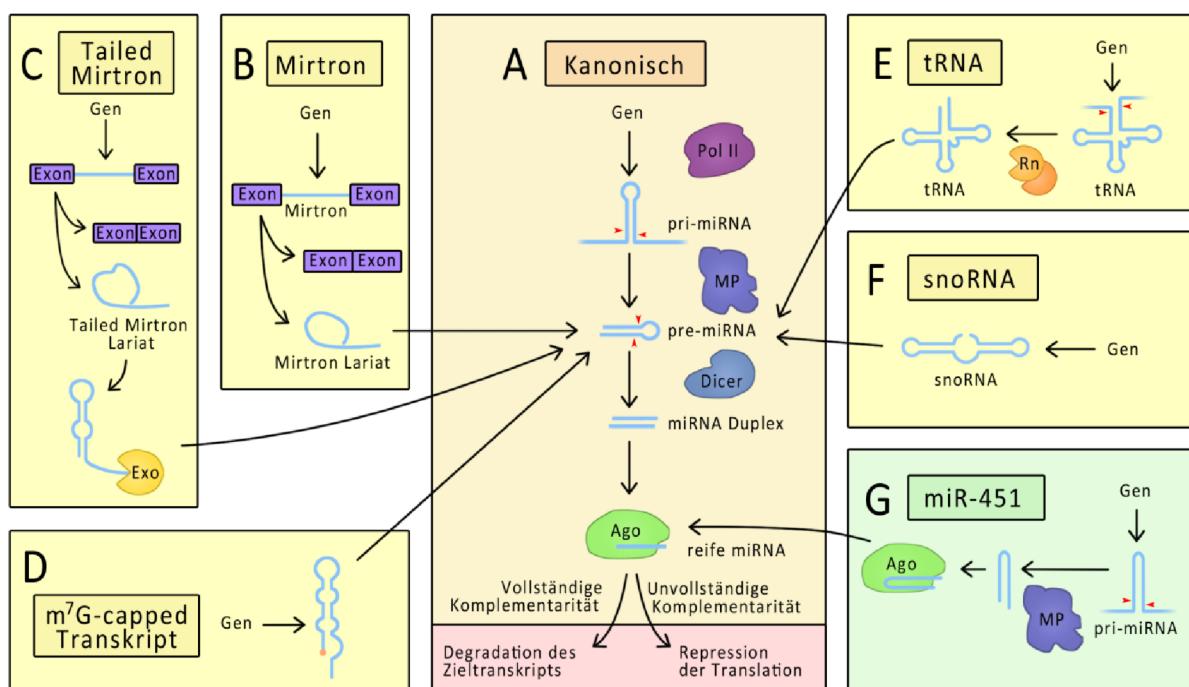


Abbildung 3: MicroRNA Biogenese. A) Während der kanonischen miRNA-Prozessierung wird die pri-miRNA zunächst von Microprocessor (MP) in eine pre-miRNA gespalten, durch Exportin-5 in das Zytosol transloziert und durch Dicer weiter gespalten, um ein kurzes miRNA-Duplex zu bilden. Dieses Duplex wird in Argonaute-Proteine (Ago) aufgenommen und entwunden, sodass ein miRNA-induzierter Silencing-Komplex (miRISC) entsteht, der die reife miRNA enthält. Dieser Komplex bindet an komplementäre Transkripte. Je nach Grad der Komplementarität wird das Zieltranskript abgebaut oder die Proteinsynthese gehemmt. B – G) Nicht-kanonische Wege der miRNA-Biogenese: Die Entstehung von miRNAs aus Mirtrons, (m^7G)-capped Transkripten, tRNAs und snoRNAs sind Microprocessor-unabhängig. Die Biogenese von hsa-miR-451 verläuft Dicer-unabhängig. Exo = Exosom; Pol II = RNA-Polymerase II; pre-miRNA = Vorläufer-miRNA; pri-miRNA = Primäre miRNA; Rn = RNase; snoRNA = Kleine nukleoläre RNA, tRNA = Transfer-RNA.

Der erste Schritt der kanonischen miRNA-Biogenese findet im Zellkern statt, wo miRNA-kodierende Sequenzen von der RNA-Polymerase II in primäre miRNAs (pri-miRNAs), die auch Teil von längeren prä-mRNAs sein können, transkribiert werden [88, 89]. Die miRNA-Prozessierung beginnt mit der Spaltung der haarnadelförmigen pri-miRNA durch Microprocessor, einem Komplex, der aus Drosha, DGCR8 und weiteren RNA-bindenden Proteinen besteht, in eine Vorläufer-miRNA (*precursor-miRNA*, pre-miRNA). Drosha schneidet mit einem 3' Offset von 2 nt an der Basis der doppelsträngigen Region der Haarnadel und es entsteht eine *stem-loop* Struktur mit einer Länge von 60 – 80 nt. Die pre-miRNA wird durch Exportin-5 in das Zytoplasma transloziert. Dort wird der *loop* durch einen Enzymkomplex aus Dicer/TRBP und abermals mit einem 2 nt 3' Offset abgespalten, sodass ein kurzes miRNA-Duplex entsteht [90–92]. Das resultierende Duplex wird von einem Argonaute-Protein aufgenommen und entwunden, sodass nur ein Strang (= reife miRNA) in dem sogenannten miRNA-induzierten Silencing-Komplex (*miRNA-induced silencing complex*, miRISC) verbleibt. Dieser bindet miRNA-abhängig an Transkripte mit passenden Sequenzen und vermittelt deren Abbau oder hemmt deren Translation in Proteine [88, 93, 94]. Je nachdem, welcher miRNA-Duplex-Strang in den miRISC inkorporiert wurde, wird das Suffix "-3p" oder "-5p" zur Bezeichnung des genauen reifen miRNA-Moleküls verwendet [95, 96]. Üblicherweise wird kein Suffix genannt, wenn in miRBase nur eine reife miRNA beschrieben ist. Durch ungenaue miRNA-Spaltung während der Biogenese sowie durch *trimming*, *tailing* und auch RNA-Editierung können Isoformen reifer miRNAs mit abweichenden Sequenzen, sogenannte IsomiRs, entstehen [97], für die Cloonan *et al.* eine Nomenklatur entwickelt haben [98]. Diese IsomiRs können in 5', 3' und interne Isoformen eingeteilt werden [97]. Für das 3' Ende wurde eine höhere Heterogenität beschrieben [99]. Reife miRNAs werden als „miR“ abgekürzt, während die Vorläufermoleküle als „mir“ abgekürzt werden [100]. Humane miRNAs haben das speziespezifische Präfix „hsa-“ (*Homo sapiens*).

Verschiedene nicht-kanonische Wege der miRNA-Biogenese, welche Microprocessor- oder Dicer-unabhängig sind, wurden beschrieben [87]. Aus dem Spleißen von anderen Transkripten können haarnadelförmige Introns hervorgehen, die man Mirtrons nennt [101]. Da sie bereits eine Haarnadelstruktur haben, werden sie im Anschluss nur noch durch Dicer gespalten, bevor sie in Argonaute inkorporiert werden. Es können auch *tailed* Mirtrons mit einem 3' oder 5'-Schwanz entstehen, die zunächst durch Drosha-unabhängige Nukleasen gekürzt werden [73]. Weiterhin können durch die RNA-Polymerase II haarnadelförmige Transkripte mit einer 7-Methylguanin-5' *cap* entstehen, die ebenfalls die Prozessierung durch Microprocessor überspringen und von Dicer gespalten werden. Bei diesen nicht-kanonischen miRNAs hemmt die 5' *cap* die Aufnahme in Argonaute, sodass vordergründig reife 3p-miRNAs entstehen [84]. Weiterhin können Drosha-unabhängige miRNAs aus hairpin-ähnlichen Strukturen, wie Transfer-RNAs, die das strukturgebende

La-Protein verloren haben, und kleinen nukleolären RNAs (snoRNAs), entstehen [84]. Für hsa-miR-451 wurde ein Dicer-unabhängiger Biogeneseweg beschrieben. Die pri-miRNA wird von Microprocessor geschnitten und es entsteht eine pre-miRNA, die zu kurz für eine Spaltung durch Dicer ist und stattdessen direkt in Argonaute inkorporiert wird, wo der 3p-Arm abgeschnitten und mithilfe von der PARN-Exonuklease gekürzt wird [73]. Nicht-kanonische miRNAs sind in der Regel in geringem Maße genetisch konserviert und machen tendentiell nur einen geringen Anteil aller experimentell nachgewiesenen miRNA aus [73].

Regulation der microRNA-Biogenese

Die Spaltung von miRNAs durch Microprocessor bestimmt, welche miRNAs den kanonischen Biogeneseweg durchlaufen und ist damit der entscheidende Schritt in der Entstehung von miRNAs [85, 102]. Die Prozessierung durch Microprocessor kann durch Sequenzmotive des miRNA *stem-loops* beeinflusst werden (s. Abbildung 4). Der *stem-loop* besteht optimalerweise aus einem 35 nt langen Doppelstrang, der in einen oberen, ca. 22 nt langen *stem* (der die Sequenz des miRNA-Duplex beinhaltet) und einen unteren, ca. 13 nt langen *stem*, unterteilt wird [103]. Apikal befindet sich ein einzelsträngiger *loop*, welcher die beiden Stränge des *stems* miteinander verbindet [104]. Unterhalb des *stems* befinden sich beidseitig 3' und 5' flankierende einzelsträngige Segmente, welche mindestens 9 nt lang sind [105, 106].

Microprocessor ist ein trimerischer Komplex, bestehend aus Drosha und einem DGCR8-Dimer [107]. Drosha interagiert mit seinen RNA-bindenden Domänen mit dem basalen GHG-Motiv, wobei das H für A, C oder U steht, und mit dem flankierenden UG-Motiv [103, 108]. Das DGCR8-Dimer bindet an das apikale UGU- oder GUG-Motiv [107, 109]. Anhand dieser Motive richtet sich Microprocessor an der pri-miRNA aus und schneidet 22 bzw. 24 nt unterhalb des *loops* und 13 bzw. 11 nt oberhalb der einzelsträngigen flankierenden Segmente [103, 106, 110]. Dabei entsprechen 11 nt etwa einer helikalen Windung (nicht in Abbildung 4 gezeigt) [108]. Pri-miRNAs mit einem kürzeren oder längeren *stem* führen dazu, dass Microprocessor sich nicht optimal ausrichten kann und gegebenenfalls inakkurat oder an alternativen Stellen spaltet [110]. Für eine effiziente Spaltung ist es günstig, wenn der *stem* bis auf das H im GHG-Motiv perfekt gematched ist. Insbesondere im oberen *stem* sind einzelne *mismatches*, also ungepaarte Basen, G-U Wobble-Basenpaare und einzelne Nukleotide (nt), die Ausbuchtungen bilden, möglich [88, 103]. Weitere RNA-bindende Proteine, unter anderem SRSF3 oder DDX17, können das flankierende CNNC-Motiv, welches in einem Drittel der humanen pri-miRNAs vorliegt, erkennen und die Microprocessor-Aktivität beeinflussen [108, 111]. SNPs, die in den beschriebenen Sequenzmotiven liegen, können die Prozessierung der pri- zur pre-miRNA Genotyp-abhängig beeinflussen. Obwohl pri-miRNA-Sequenzmotive die Prozessierung durch Microprocessor

regulieren, beinhalten nur ca. 80 % aller konservierten humanen miRNAs mindestens eins der beschriebenen Motive [108]. Es wird davon ausgegangen, dass weitere, bislang unbekannte Sequenzmotive und Proteinfaktoren Auswirkungen auf die Spaltung durch Microprocessor haben [108].

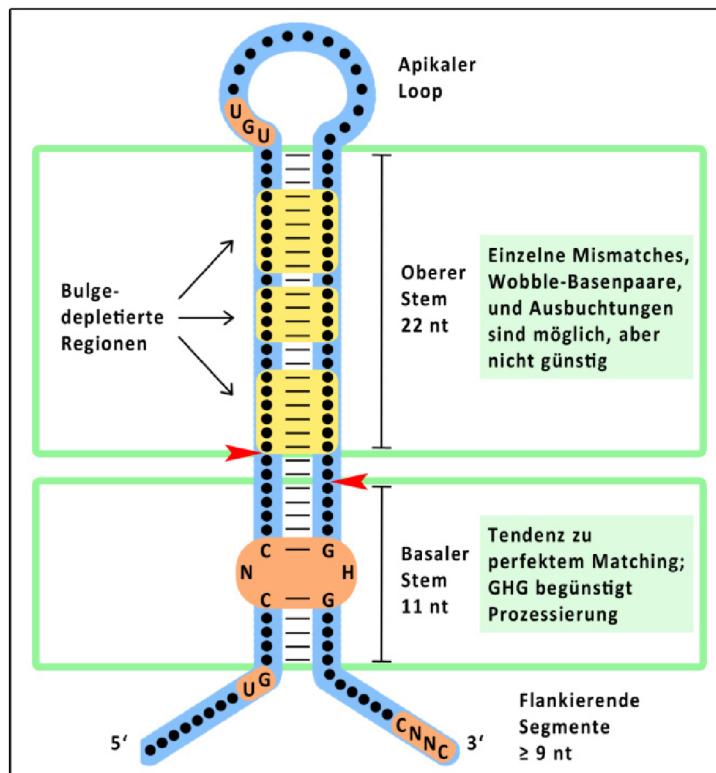


Abbildung 4: Pri-miRNA Sequenzmotive. Die Primärsequenz der pri-miRNA hat einen Einfluss auf die Spaltung durch Microprocessor. Die optimale Länge des *stems* der pri-miRNA für die exakte Prozessierung durch den trimerischen Microprocessor-Komplex liegt bei 35 nt. Drosha interagiert mit dem basalen GHG- (H = A, C oder U) und dem flankierenden UG-Motiv. Das DGCR8-Dimer interagiert mit dem UGU- oder GUG-Motiv in dem apikalen *loop*. Darüber hinaus können weitere RNA-bindende Proteine, wie SRSF3 und DDX17, durch Interaktion mit Sequenzmotiven in den flankierenden Segmenten, wie dem CNNC-Motiv, die Prozessierung durch Microprocessor beeinflussen. Im oberen *stem* können einzelne *mismatches*, Wobble-Basenpaare und Ausbuchtungen vorkommen, welche sich jedoch nicht günstig auf die Prozessierung auswirken. nt = Nukleotid; pri-miRNA = Primäre miRNA

Regulationsmechanismen durch microRNAs

Eine miRNA kann die Translation hunderter Gene inhibieren und jede mRNA kann wiederum durch mehrere verschiedene miRNAs reguliert werden. Die Bindung der sogenannten *seed*-Region von miRNAs (Nukleotide an Position 2 – 7 vom 5' Ende) und komplementären Sequenzen vorzugsweise in den 3' untranslatierten Regionen (3' UTRs) der Ziel-mRNAs vermittelt bei vollständiger Übereinstimmung die Spaltung der gebundenen Transkripte und bei unvollständiger Übereinstimmung andere Formen der Repression, wie die Destabilisierung der gebundenen Transkripte [112]. Zusätzliche Basenpaarungen zwischen dem Transkript und der miRNA können die

seed-Bindung verstärken, wie von Bartel in 2018 beschrieben wurde [73]. Beim Menschen überwiegt die Zieltranskript-Destabilisierung durch Deadenylierung und anschließenden exonukleolytischen Abbau den regulatorischen Effekt von miRNAs, während die direkte translatorische Repression einen geringeren Beitrag leistet [113–117]. Die Zieltranskripte von 5' IsomiRs können sich aufgrund ihrer abweichenden *seed*-Sequenzen von denen der entsprechenden kanonischen miRNAs unterscheiden [73, 97]. Bis heute wurden mehr als 400.000 regulatorische Interaktionen in miRTarBase (Version 8), einer Datenbank, die miRNA-Ziel-Interaktionen aus der Literatur beinhaltet, erfasst [118]. Andere Datenbanken, wie miRWalk 3.0, können zur Vorhersage von miRNA-Ziel-Interaktionen auf der Grundlage verschiedener Algorithmen, welche z.B. die Sequenz-Komplementarität, Bindungsenergie und Sequenzkonservierung einbeziehen, verwendet werden [119]. Einige miRNAs können auch durch die Interaktion mit Zieltranskripten selbst destabilisiert werden; ein Mechanismus der als *target-directed miRNA degradation* bezeichnet wird [120].

MicroRNAs bei der Multiplen Sklerose

Verschiedene miRNAs wurden bei Patienten mit MS und mit verschiedenen MS-Verlaufsformen, unter Therapie und in Zusammenhang mit Umweltfaktoren und SNPs in Bezug auf ihre Expression als verändert beschrieben. Bereits in einer der ersten Studien zu miRNAs bei MS in 2009 beschrieben Keller *et al.*, dass hohe Expressionslevel von hsa-mir-145 in Vollblut, gemessen mit einem Microarray speziell für reife miRNAs, die Unterscheidung von MS-Patienten und Kontrollen mit einer Spezifität von 89,5 % und einer Sensitivität von 90 % erlaubt [121]. Seitdem werden miRNA-Signaturen als diagnostische und prädiktive Biomarker bei der MS und die Nutzung von miRNAs als therapeutische Ziele oder Wirkstoffe intensiv beforscht [122–125].

In CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen sowie B-Zellen von MS-Patienten wurden reife miRNA-Moleküle aus den hsa-mir-320a- und hsa-mir-132-Loci als dysreguliert beschrieben [126]. In dem gleichen Artikel wurden in Läsionen und Kapillaren im Hirn von MS-Patienten dysregulierte miRNAs genannt. Hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-30a-5p und hsa-miR-146a-5p wurden in Blutzellen von MS-Patienten als differentiell exprimiert beschrieben und Netzwerkanalysen deuteten auf die Beteiligung bei immunologischen und neurologischen Signalwegen hin [127]. Hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-223-3p wurden bereits mehrfach bei der MS und anderen immunvermittelten Erkrankungen als dysreguliert beschrieben und als potentielle Regulatoren des Inflammasom-Pathways identifiziert [128]. Weiterhin wurden diverse miRNAs beschrieben, für die sich die Expressionslevel in Blutzellen unter Therapie mit IFN-β, Glatirameracetat, Fingolimod oder Natalizumab verändern [129–134]. Für hsa-miR-92a-1-5p-Level, gemessen mit miRNA-spezifischen qPCR-Assays, konnte eine Assoziation mit dem Behinderungsgrad der Patienten, gemessen anhand der EDSS-Skala, und mit der Krankheits-dauer

gezeigt werden [135]. Für eine Nutzung von miRNAs als diagnostische Biomarker im Blut zeigen insbesondere Signaturen von mehreren miRNAs vielversprechende Ergebnisse: Die Level von hsa-miR-140-5p, hsa-miR-320a-3p, hsa-miR-320c-3p, hsa-miR-484-5p und hsa-miR-486-5p im Serum unterschieden sich signifikant zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen [136].

Interaktionen zwischen Umweltfaktoren, die mit MS assoziiert sind, und miRNAs wurden ebenfalls diskutiert. Für primäre humane B-Zell-Kulturen wurde gezeigt, dass eine Infektion mit EBV zur Herunterregulation der Expression mehrerer miRNAs, wie Mitgliedern der hsa-let-7-Familie, für die Funktionen als Tumorsuppressoren und anti-virale Mediatoren beschrieben wurden, führt [137]. In EBV-infizierten B-Zellen sind einige miRNAs, wie hsa-mir-34a, wiederum hochreguliert [138]. EBV und andere Viren kodieren außerdem selbst für miRNAs [139]. Für das Rauchen konnte gezeigt werden, dass die Expression von miRNAs im Serum beeinflusst wird und die verändert exprimierten miRNAs eine Rolle bei der Modulation von inflammatorischen Signalwegen spielen [140].

Sind die Expressionslevel von miRNAs mit den verschiedenen Ausprägungen von genetischen Varianten assoziiert, spricht man von miR-eQTLs [141, 142]. Für nur wenige MS-assozierte SNPs, welche in oder nahe miRNA-kodierenden Sequenzen liegen, wurden bislang miR-eQTL-Effekte beschrieben. So liegt der SNP rs2910164, welcher mit einer veränderten Krankheitssuszeptibilität bei weiblichen Personen assoziiert ist, in der hsa-mir-146a-kodierenden Sequenz. Für das C-Allel des SNPs wurde eine erhöhte miRNA-Expression beschrieben [143]. Weiterhin wurden in MS-Patienten, welche das MS-assozierte Allel des SNPs rs1414273 tragen, erhöhte hsa-miR-548ac-3p-Expressionslevel in Blutzellen beschrieben [144].

Etwa ein Viertel der genetischen Varianten, die mit MS assoziiert sind [36], liegen in oder nahe (< 100 kb) miRNA-kodierenden Sequenzen. Weitere mit MS-assozierte genetische Varianten befinden sich in Genen, dessen Transkripte miRNA-Bindestellen enthalten, wie für das Zytokin BAFF gezeigt wurde [145]. Viele dieser miRNAs wurden erst in den letzten Jahren identifiziert [81] und noch nicht in Hinblick auf ihre regulatorische Funktion, zelltyp- und gewebespezifische Expression und differentielle Expression in MS-Patienten gegenüber Gesunden untersucht. Es ist weitestgehend unklar, ob und inwiefern die genetischen Risikovarianten die Transkription oder RNA-Prozessierung von miRNA-kodierenden Sequenzen beeinflussen. Wie bereits für andere Erkrankungen gezeigt [80], könnten solche Mechanismen auch kausal an der MS-Entstehung und -Progression beteiligt sein. In der vorliegenden Arbeit wurden genetisch mit MS-assozierte miRNAs und entsprechende regulatorische Mechanismen, die zur Pathogenese der Krankheit und der verschiedenen Verlaufsformen beitragen könnten, untersucht.

2. ZIELE DER STUDIE

Das übergeordnete Ziel der Untersuchungen war es, das Verständnis der genetischen Prädisposition für MS und der Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankung zu verbessern. Für die überwiegende Mehrheit der über 200 bekannten MS-assoziierten genetischen Loci sind die kausalen SNPs und die biologischen Mechanismen, durch die sie zur MS beitragen, nicht bekannt. Seit 2009 wurde in Studien vermehrt gezeigt, dass einige miRNAs, kleine Moleküle, welche die Genexpression posttranskriptionell regulieren, bei MS eine Rolle spielen. Verschiedene miRNAs regulieren immunologische und neurologische Signalwege. Außerdem sind für die Expressionslevel von mehreren miRNAs bereits Assoziationen mit den MS-Verlaufsformen, dem Therapieansprechen und mit MS-assoziierten Umweltfaktoren bekannt. Ungefähr ein Viertel der etwa 200 MS-assoziierten genetischen Regionen kodiert neben anderen Genen auch für humane miRNAs. SNPs innerhalb und in der Nähe von miRNA-kodierenden Sequenzen können die Biogenese von miRNAs und damit auch molekulare Signalwege, die durch miRNAs reguliert werden, modulieren und somit kausal zur Pathogenese von Erkrankungen, wie der MS, beitragen. B-Zellen werden als wichtige Treiber der Krankheit angesehen, da B-Zell-depletierende Therapien den Krankheitsverlauf bei MS-Patienten wirkungsvoll beeinflussen können, und daher ist die Expression von miRNAs in diesen Zellen von besonderem Interesse. Mittels Datenbanken-basierten Ansätzen (*in silico*), Zellkulturexperimenten (*in vitro*) und der Untersuchung von Blutproben von MS-Patienten und gesunden Kontrollen (*in vivo*) wurden in der vorliegenden Arbeit vier Studienziele verfolgt:

A) Bestimmung von miRNAs, die genetisch mit MS assoziiert sind

Dieser Teil der Arbeit sollte beantworten, wieviele miRNA-kodierende Sequenzen in einem Haplotyp-Block mit bekannten MS-assoziierten *lead* SNPs liegen. Ziel der Untersuchung war es zu bestimmen, wie viele dieser miRNAs SNPs enthalten, die in LD mit den MS *lead* SNPs sind und welche SNPs die Microprocessor-Spaltung beeinflussen könnten. Somit sollten genetische Varianten, welche über die Dysregulation von miRNAs kausal an der MS-Pathogenese beteiligt sein können, identifiziert werden.

B) Untersuchung einer SNP-abhängigen Spaltung der miRNAs durch Microprocessor

Es wurde der Frage nachgegangen, ob und wie stark SNPs in oder nahe den miRNA-kodierenden Sequenzen die Effizienz der Spaltung der pri-miRNAs durch Microprocessor, und damit die reifen miRNA-Expressionslevel, verändern können. Dies könnte einen kausalen Mechanismus, über den SNPs zur MS beitragen, aufzeigen. Für die Untersuchung sollte in menschlichen Zellen eine auf einem Luciferase-Reportersystem basierende Methode etabliert werden.

C) Identifizierung von Zielgenen dieser miRNAs in menschlichen Zellen

In der vorliegenden Arbeit sollten die Funktionen von miRNAs, deren Prozessierung von SNPs abhängt, beleuchtet werden. Gene, die in Folge einer Überexpression der ausgewählten miRNAs herunterreguliert sind, könnten Zielgene der miRNAs darstellen. Veränderungen der miRNA-Biogenese aufgrund von SNPs können sich auf die Regulation der miRNA-Zielgene auswirken und somit zur MS-Pathogenese beitragen.

D) Analyse der Expression von miRNAs sowie deren *host* Genen und Zielgenen in B-Zellen von MS-Patienten und gesunden Kontrollen und Genotypisierung von MS-assozierten SNPs

Als weiteres Ziel dieser Arbeit war es, humane B-Zellen von MS-Patienten, mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen und unter verschiedenen Therapien, und von gesunden Kontrollen zu untersuchen. B-Zell-Subpopulationen sollten charakterisiert werden. Der Fokus dieses Parts lag darauf, ob sich die Expression von genetisch mit MS-assozierten miRNAs in B-Zellen von MS-Patienten und von gesunden Kontrollen unterscheidet. Ein besonderes Anliegen war hierbei auch die Quantifizierung von ausgewählten IsomiRs. Die Expression von an der miRNA-Biogenese beteiligten Genen, miRNA *host* Genen und Zielgenen sollte ebenfalls betrachtet und Zusammenhänge zwischen der miRNA- und *host* Gen-Expression und den Genotypen der MS-assozierten SNPs eruiert werden.

Die vorliegende Arbeit thematisiert den Effekt von MS-assozierten genetischen Varianten auf die Expression von miRNAs und die Erforschung der spezifischen Funktion solcher miRNAs. Die Erkenntnisse dieser Arbeit haben zum Ziel, das Verständnis der kausalen molekularen Mechanismen, die am genetischen Risiko der Entwicklung der MS beteiligt sind, zu verbessern. Durch die Untersuchung von miRNA-Signaturen und der Expression von Genen aus den gleichen Loci sowie der Zielgene der miRNAs in B-Zellen und der Bestimmung der Allele von MS-assozierten SNPs in MS-Patienten und gesunden Kontrollen sollten die Ergebnisse aus den experimentellen Zellkultur-Untersuchungen in einen klinischen Kontext gesetzt werden. Die Dysregulation von miRNAs und IsomiRs bei MS-Patienten könnte neue Hinweise auf die Nutzbarkeit der miRNAs als Biomarker bei MS liefern oder molekulare Mechanismen aufzeigen, die für neue therapeutische Ansätze ausgenutzt werden könnten.

3. SCHEMATISCHER ÜBERBLICK DER METHODEN

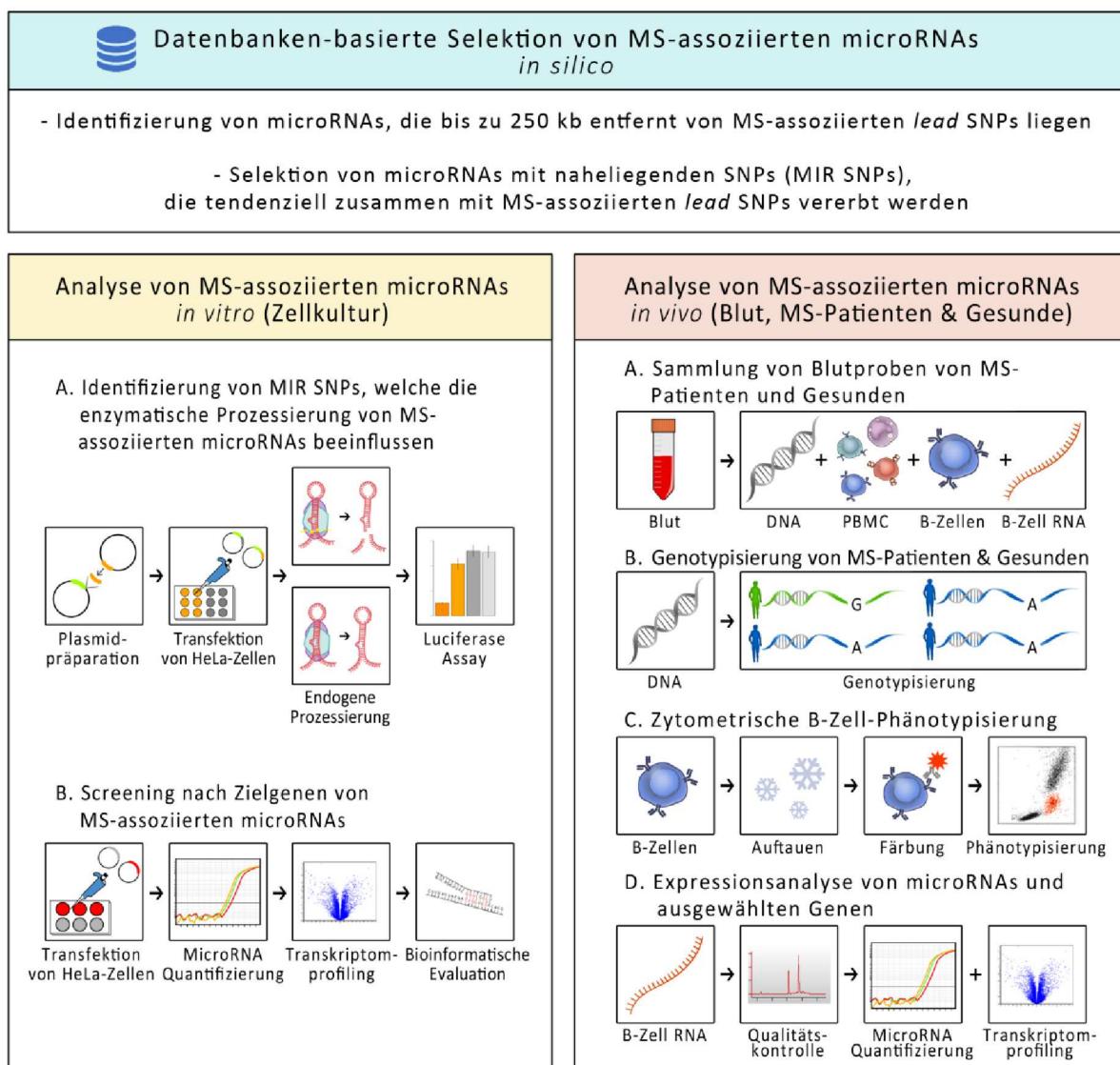


Abbildung 5: Schematischer Überblick über das Dissertationsprojekt. Das Projekt umfasste drei methodische Teile: Zunächst wurden miRNAs, die genetisch mit der MS assoziiert sind, durch einen Datenbanken-basierten Ansatz identifiziert. Zweitens wurden die ausgewählten miRNAs in HeLa-Zellen analysiert. Die Wirkung von SNPs innerhalb oder nahe der miRNA-kodierenden Regionen auf die enzymatische Spaltung der miRNAs durch Microprocessor wurde mit Luciferase-Reporter-Assays untersucht. Mittels Transkriptomprofiling wurde nach Zielgenen der identifizierten miRNAs gescreent. Drittens wurden DNA, PBMC, B-Zellen und B-Zell-RNA von MS-Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen und von gesunden Kontrollen gesammelt. Die Probanden wurden im Hinblick auf MS-assoziierte SNPs innerhalb der miRNA-kodierenden Regionen genotypisiert. Mit Durchflusszytometrie wurden B-Zell-Populationen phänotypisiert. Reife miRNAs und IsomiRs wurden mit speziellen qPCR-Assays quantifiziert. An der miRNA-Biogenese beteiligte Gene, *host* Gene und miRNA-Zielgene wurden in einem Transkriptom-basierten Ansatz analysiert. kb = Kilobase; MS = Multiple Sklerose; PBMC = Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus.

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1 MATERIALIEN

Die Zelllinien, Materialien, Rezepte für Pufferlösungen, Geräte, Datenbanken und Softwares, welche für die bioinformatischen und experimentellen Teile dieser Arbeit und für die Auswertung verwendet wurden, sind in Anhang 12.1 dieser Arbeit aufgelistet.

4.2 DATENBANKEN & BIOINFORMATISCHE TOOLS FÜR DIE RNA-ANALYSE

IsomiR Bank

IsomiR Bank ist eine unter <https://mcg.ustc.edu.cn/bsc/isomir/> frei zugängliche Ressource. Die Datenbank enthält Informationen zu 308.919 IsomiRs von 4.706 reifen miRNAs. Mit Hilfe des Algorithmus CPSS [146] und basierend auf insgesamt 2.727 *small RNA Next generation sequencing* (NGS)-Datensätzen zu acht Spezies wurden IsomiRs identifiziert. 977 Datensätze stammen aus Proben von *Homo sapiens*. Für jede IsomiR werden ihre Sequenz, der kanonische miRNA-Name, die Gewebeherkunft, die Studie, in der sie nachgewiesen wurde, und ihre Expressionsdaten in rpm (*reads per million*) angegeben [147].

LDlink

LDlink, erreichbar unter <https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=home/>, bietet eine Zusammenstellung von online-Anwendungen für die Analyse und Visualisierung von Parametern des LDs in 26 menschlichen Bevölkerungsgruppen [38]. In der vorliegenden Studie wurden LDpair und LDproxy verwendet. LDpair kann verwendet werden, um die Korrelation der Allele von zwei genetischen Varianten zu untersuchen. Als Output liefert LDpair die Verteilung der verschiedenen Haplotypen in der ausgewählten Population sowie die statistischen Werte D' und r^2 [148]. Das LDproxy-Tool liefert ebenfalls D' - und r^2 -Werte sowie Informationen über die Korrelation von Allelen für die abgefragte Variante und jede proximale Variante in der ausgewählten genomischen Region und visualisiert die Informationen [38].

miRBase

Die Datenbank miRBase Version 22 (<http://www.mirbase.org/>) enthält Informationen zu 38.589 Vorläufer-miRNAs und 48.860 reifen miRNA-Produkten von 271 Spezies. Darunter sind 2.883 humane reife miRNAs. Jeder Eintrag umfasst eine vorhergesagte Haarnadelstruktur und reife miRNA-Sequenzen, Informationen über die genomische Lage der miRNA, ihre Zugehörigkeit zu einer miRNA-Familie, Expressionsdaten (in rpm) aus *deep sequencing*-Experimenten sowie Literaturverweise. Die

Expressionsdaten basieren auf 1.493 *small RNA deep sequencing*-Datensätzen [81]. Die Datenbank miRBase ist die Standard Referenzdatenbank für die Annotation von miRNAs [149]. In miRBase ist pro *stem-loop* Sequenz und pro Strang (3p oder 5p) höchstens eine reife miRNA annotiert [81]. Fast alle kommerziell verfügbaren Assays und bioinformatischen Vorhersagetools für die Analyse von miRNAs beziehen sich ausschließlich auf die in miRBase angegebenen Sequenzen. Die Heterogenität von reifen miRNAs und ihren Isoformen ist in dieser Datenbank nicht abgebildet.

miRCarta

miRCarta kann über <https://mircarta.cs.uni-saarland.de/> aufgerufen werden und bündelt Daten aus verschiedenen Quellen wie miRMaster, miRTarBase und miRBase Version 21 sowie Expressionsdaten aus 18.035 *small RNA sequencing*-Datensätzen [150]. Jeder der 12.857 Einträge zu Vorläufer-miRNAs beinhaltet die dazugehörigen reifen miRNAs, Informationen zur Sequenz und genomischen Lokalisation, eine mit RNAfold [151] berechnete Hairpin-Struktur, Expressions-Pileup-Plots und Literaturverweise. Für die *Pileup*-Plots werden alle *reads* aus den Sequenzierungsdatensätzen mit den Vorläufersequenzen abgeglichen und gestapelt. Für jede Base wird visualisiert, wie oft sie als Teil einer miRNA sequenziert wurde. Auf dieser Grundlage sind Sequenzen für reife miRNA-Kandidaten annotiert, die möglicherweise nicht mit denen in miRBase identisch sind [150].

UCSC Genome Browser

Der UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>) visualisiert auf interaktive Weise genomische Daten für das menschliche Referenzgenom, Version hg38, welches vom Genome Reference Consortium kompiliert wurde. Der Browser stellt auch Referenzgenome von anderen Spezies zur Verfügung. Das Referenzgenom hg38 kann nach einem Gennamen, einer genomischen Position und nach weiteren Suchbegriffen durchsucht werden. Der Output einer Suche stellt den genomischen Kontext für den Suchbegriff inklusive umliegender annotierter Transkripte, bekannter genetischer Varianten und Informationen über artenübergreifende Sequenzkonservierung dar [152].

4.3 DATENBANKEN-BASIERTE SELEKTION VON MS-ASSOZIIERTEN MICRORRNAs

Genetisch mit MS assoziierte miRNAs wurden in fünf Schritten selektiert: Zunächst wurden miRNAs identifiziert, die innerhalb eines Abstands von 250 Kilobasen (kb) von MS-assozierten genetischen Varianten kodiert sind. Zweitens wurden die Regionen, welche die miRNAs kodieren, auf Polymorphismen, die dazu tendieren, zusammen mit den MS-assozierten *lead* SNPs vererbt zu werden, gescreent. Drittens wurden miRNAs ausgewählt, bei denen die *stem-loop*-kodierenden DNA-Sequenzen und/oder ihre flankierenden Regionen SNPs mit MAFs > 1 % enthalten. Viertens wurden

diejenigen miRNAs mit SNP-Allelen, die in LD mit den Allelen der nahegelegenen MS-assozierten *lead* SNPs liegen, ausgewählt. Fünftens wurden miRNAs ausgeschlossen, von denen nicht zu erwarten ist, dass sie Microprocessor-abhängig prozessiert werden.

I. Die genomischen Lokalisationen von 233 MS-assozierten *lead* SNPs wurden aus der jüngsten GWAS extrahiert, in der sie beschrieben wurden [36]. Die genomischen Koordinaten aller bekannten humanen Vorläufer-miRNAs (n = 1881) wurden aus der miRBase-Datenbank (Release 21) extrahiert. Mit Hilfe der Softwareumgebung R wurden die Distanzen zwischen den MS-assozierten Varianten und den miRNAs berechnet. MiRNAs, die in einem Abstand von 250 kb von MS-assozierten genetischen Varianten kodiert sind, wurden identifiziert.

II. Das LDproxy-Tool (<https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=ldproxy>, 8.11.2017, basierend auf 1000G-Panel / dbSNP 142, ausgewählte Populationen: alle EUR) wurde verwendet, um die r^2 -Werte der MS-assozierten *lead* SNPs mit allen proximalen SNPs darzustellen und die Positionen der umliegenden Gene zu visualisieren. Der r^2 -Wert reicht von 0 – 1 und ein niedriger Wert zeigt an, dass die Allele zweier genetischer Varianten unabhängig voneinander auftreten, während ein hoher Wert indiziert, dass ein Allel einer Variante zur Vorhersage eines Allels einer anderen Variante verwendet werden kann. Es wurden diejenigen miRNAs mit SNPs in ihren genomischen Regionen bestimmt, die in LD mit $r^2 > 0,1$ mit den MS-assozierten *lead* SNPs liegen. Dieser großzügige r^2 -Cutoff-Wert wurde gewählt, um Unterschiede der MAFs von zwei SNPs zu berücksichtigen. MS *lead* SNPs, die keine dbSNP-Identifikatoren hatten oder nicht im 1000G/dbSNP142-Panel enthalten waren, auf dem LDproxy basiert, wurden ausgeschlossen.

III. Unter Verwendung der dbSNP-Version 150 im UCSC Genome Browser wurden SNPs mit einer globalen MAF > 1 % identifiziert, die innerhalb der miRNA-kodierenden DNA-Sequenzen (nach miRBase *stem-loop* Annotation) und 50 umliegenden Basenpaaren liegen.

IV. Das LDpair-Tool des LDlink-Webservers (<https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=ldpair>, 22.11.2017, basierend auf dem 1000G-Panel/dbSNP 142, ausgewählte Populationen: alle EUR) wurde zur Berechnung der D'-Werte der MIR SNP–MS *lead* SNP-Paare aus Schritt III verwendet. Der D'-Wert reicht ebenfalls von 0 – 1 und ein niedriger Wert zeigt an, dass das kombinierte Vorkommen der Allele zweier genetischer Varianten nicht verknüpft ist, während ein Wert von 1 anzeigt, dass mindestens eine Haplotyp-Kombination nicht vorkommt (vollständiges LD). Im Gegensatz zu r^2 wird der D'-Wert nicht durch Unterschiede in den Allelhäufigkeiten zweier SNPs beeinflusst. Für die MIR SNP–MS *lead* SNP-Paare wurde ein D'-Wert von > 0,7 gefordert. Für diejenigen MIR SNPs, die nicht ins LDpair-Tool eingepflegt sind oder die zu niedrige MAFs für die D'-Berechnung aufwiesen, wurden benachbarte SNPs mit herangezogen.

V. Die identifizierten Vorläufer-miRNAs wurden auf Basis der Informationen in den miRBase-Datenbankeinträgen (Release 21) weiter analysiert. Vorläufer-miRNAs, für die es keinen Hinweis darauf gab, dass die lokalen SNPs die kanonische Prozessierung durch Microprocessor beeinflussen, wurden ausgeschlossen. Ausgeschlossen wurden miRNAs mit SNPs, durch die eine Base in dem terminalen unstrukturierten *loop* verändert wird (möglicherweise relevant für das pre-miRNA-Dicing), sowie Mirtrons, welche vom Spleißosom (und nicht von Microprocessor) gespalten werden.

4.4 KULTIVIERUNG VON HE LA-ZELLEN

HeLa-Zellen wurden in DMEM + 10 % FBS und 50 U/ml Penicillin-Streptomycin in T25-Flaschen kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und mit 0,5 ml Trypsin-EDTA bei 37°C und 5 % CO₂ für 5 min inkubiert. Die Überprüfung auf Ablösung der Zellen erfolgte mikroskopisch, bevor 9 ml Medium hinzugefügt wurden. Die Zählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Insgesamt 250.000 Zellen wurden in einer neuen T25-Flasche ausgesät und mit Medium auf 5 ml aufgefüllt. Die Inkubation der Zellen verlief bei 37°C und 5 % CO₂. HeLa-Zellkulturen wurden zweimal wöchentlich passagiert.

4.5 PLASMIDPRÄPARATION

Genetische Konstrukte

Für die zehn miRNAs, die sich aus der datenbankgestützten Auswahl der miRNAs (s. Kapitel 4.3) ergaben, als auch für hsa-mir-548ac und hsa-mir-16-1 wurden miExpress™ Precursor miRNA Expression Clones (nachfolgend als Vorläufer-Plasmide bezeichnet) von GeneCopoeia (s. Tabelle S 2) beschafft. Die Plasmide enthalten ein Gen für die Resistenz gegen Ampicillin, was für die Selektion von transformierten Bakterien im Rahmen der Amplifikation ausgenutzt wurde. Zudem wurden der miRNA *scrambled*-Kontrollklon für pEZX-MR04 (HmiR0001-MR04) und ein Luciferase-Reporter-Vektor (CmiT000001-MT05) erworben.

Amplifikation der genetischen Konstrukte

Die Plasmide wurden in *Escherichia coli* (*E. coli*)-Kulturen amplifiziert. Ein *E. coli*-Klon wurde von einer LB-Agarplatte gepickt und in 2 ml Tetracyclin-supplementiertem TY-Medium in einem Reagenzglas mit Metallkappe kultiviert. Die Kultivierung des Klons verlief einem Schüttelinkubator bei 37°C und 200 U/min für 16 h. Danach wurde die Kultur auf einem Vortexer gemischt und in einen 250 ml-Kolben mit 100 ml Medium überführt. Die Inkubation der Bakterien erfolgte bei 37°C und 200 U/min, bis eine optische Dichte von 0,3 erreicht wurde, in zwei 50 ml-Röhrchen überführt und bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets wurden in je 12 ml kaltem 0,1 M

CaCl₂ resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten Zellen wurden zentrifugiert und die Pellets in 1 ml CaCl₂ resuspendiert und auf Eis aufbewahrt.

Zu jeweils 50 µl der kompetenten Bakterien wurden 400 ng der jeweiligen Plasmide zugesetzt. Die Inkubation der Suspensionen erfolgte 10 min auf Eis, 5 min bei 37°C und 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 0,5 ml TY-Medium erfolgte die Inkubation der Kulturen 15 min bei 37°C und leichtem Schütteln. 100 µl der Suspensionen wurden ausplattiert. Die Inkubation der Kulturen verlief in einem Trockenschrank bei 37°C für 16 h. Von jeder Platte wurde ein Klon gepickt und in 2 ml Ampicillin-supplementiertem TY-Medium (TY-Amp) kultiviert. Nach 8 h Inkubation bei 37°C und 150 U/min wurden je 3 µl der Kulturen in 250 ml-Flaschen mit 30 ml Medium überführt und 16 h kultiviert.

Die Aufreinigung der Plasmide aus den *E. coli*-Kulturen erfolgte mit dem QIAGEN EndoFree® plasmid maxi-Kit und QIAfilter midi-Kartuschen gemäß den Anweisungen des Herstellers. Zusammengefasst wurden die Zellkulturen durch Zentrifugation geerntet, resuspendiert und lysiert. Die Lysate wurden durch Säulen gefiltert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Säulen wurden gewaschen und die DNA eluiert. Die DNA in den Eluaten wurde mit Isopropanol gefällt und zentrifugiert. Die DNA-Pellets wurden mit Ethanol gewaschen, zentrifugiert, luftgetrocknet und in 250 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Die Messung der DNA-Konzentrationen erfolgte mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer und dem Programm DNA-50. Bei 260 nm wurden die Nukleotide gemessen; Kontaminationen bei 230 nm bzw. 280 nm. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20°C.

Mutagenese

Mutationen, die den natürlich vorkommenden genetischen Varianten in den miRNA-kodierenden Sequenzen entsprechen, wurden in die Vorläufer-Plasmide eingebracht (mit Ausnahme von hsa-mir-548ac, für die beide Genotypen bereits aus vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe vorlagen). Für hsa-mir-4304 und hsa-mir-4464 wurden jeweils zwei verschiedene Mutationen eingebracht. In das hsa-mir-16-1-Vorläufer-Plasmid wurde eine künstliche C→T Mutation eingeführt, für die eine verminderte Spaltung von pri-mir-16-1 durch Microprocessor beschrieben wurde [108]. Die Mutation betrifft das erste C vom CNNC-Motiv, das ab Base +19 vom 3' Ende von pre-mir-16-1 beginnt.

Die Erzeugung der Mutationen in den Vorläufer-Plasmiden erfolgte mit dem QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit. Die Mutagenese-Primer wurden gemäß den Primerdesign-Empfehlungen im Protokoll zum Kit designed und von Thermo Fisher bezogen (s. Tabelle S 3). Die Plasmide wurden nach den Anweisungen des Herstellers mutagenisiert. Zusammengefasst wurden die Plasmide (jeweils 10 ng/µl, 25 ng/µl, 50 ng/µl und 100 ng/µl), die Mutagenese-Primer, dNTPs, Reaktionspuffer, QuikSolution-Reagenz, Wasser und QuikChange Lightning Enzym gemischt und in

einem Thermocycler gecycled. Der Verdau der Reaktionsprodukte erfolgte mit dem Dpn I-Enzym. Ultrakompetente XL10-Gold-Zellen wurden mit den Reaktionsprodukten transformiert und auf LB-Agarplatten ($V = 100 \mu\text{l}$) ausgestrichen. Die Inkubation der Platten bei 37°C verlief über Nacht. Am nächsten Tag wurde jeweils ein Klon gepickt und in 2 ml TY-Amp über Nacht kultiviert.

Am nächsten Tag erfolgte die DNA-Isolation mit dem Minilysat-Protokoll. Jeweils 1,5 ml der Kulturen wurden in Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation der Zellen bei 10.000 U/min und Raumtemperatur (RT) für 1 min wurden die Überstände verworfen. Die Pellets wurden in 100 μl Plasmidlösung I resuspendiert, 200 μl Plasmidlösung II wurden hinzugefügt und gemischt und 150 μl Plasmidlösung III wurden hinzugefügt und gemischt. Es folgte die Zentrifugation der Proben bei 13.000 U/min und RT für 3 min. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, die verbleibenden ausgefällten Proteine entfernt und 220 μl Isopropanol hinzugefügt. Nach Vermischung auf einem Vortexer erfolgte die Zentrifugation bei 13.000 U/min und RT für 5 min. Die Überstände wurden verworfen. Es folgte ein Waschgang der DNA in den Suspensionen mit 200 μl 70 % Ethanol und die Zentrifugation bei 13.000 U/min und RT für 1 min. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 50 μl Wasser mit 10 ng RNase resuspendiert. Je 2 μl der DNA-Lösungen wurden mit 10 μl Wasser gemischt, mit Sequenzier-Barcodes etikettiert, an die Firma Microsynth Seqlab geschickt und mit dem EGFP-C Primer aus der Microsynth-Standard-Primerliste sequenziert. Die Bestätigung des Erfolgs der Mutagenese verlief basierend auf den Sequenzier-Ergebnissen. Die erfolgreich mutierten Vorläufer-Plasmide wurden in *E. coli* mit dem QIAGEN EndoFree® plasmid maxi-Kit und QIAfilter midi-Kartuschen amplifiziert. Die Lagerung aller Plasmide erfolgte bei -20°C.

Klonierung

Die miRNA-Vorläufersequenzen wurden jeweils direkt hinter dem Gen für die sekretierte Gaussia-Luciferase (GLuc) in den Luciferase-Reporter-Vektor kloniert. Die erste Restriktion erfolgte für alle Plasmide mit dem Enzym SfaAI. In einem Gesamtvolumen von 100 μl wurden Wasser, 10 μl 10x Tango-Puffer, 5 μg des Luciferase-Vektors oder 10 μg der Vorläufer-Plasmide und 4 μl SfaAI gemischt. Die Inkubation der Platten bei 37°C verlief über Nacht. Am nächsten Tag wurden 13,25 μl 10x Tango-Puffer und 6 μl des zweiten Restriktionsenzymes zugegeben und der Ansatz für 4 h bei 37°C inkubiert. Für die hsa-mir-548ac, -3661, -3671, -4252, -4304, -4423, -4464 (rs77896647G, rs77896647A und rs80063010G) und -4492-Plasmide wurde EcoRI als zweites Enzym verwendet und für die hsa-mir-16-1, 26a-2, -199a-1, -934 und -4464 (rs80063010T)-Plasmide Xhol. Auf 2 % Agarose-TBE-Gelen erfolgte die Überprüfung der erfolgreichen Restriktion. Jeweils 2 μl der Proben und 10 μl Bromphenolblau

wurden gemischt und in die Vertiefungen der Gele pipettiert. Als Standard wurden 5 µl des Φ X-Markers verwendet. Die Gele wurden bei 90 V gefahren.

Es erfolgte die Präzipitation der restringierten Luciferase-Vektoren. Die restringierten Vorläufer-miRNA-Fragmente wurden mit dem NucleoSpin® Gel und PCR-Clean-up-Kit präpariert. Für die Präzipitation wurden den Luciferase-Vektoren 119,25 µl Isopropanol und 10 µl 3 M Natriumacetat zugesetzt. Es folgte die Zentrifugation der Proben bei 13.000 U/min und RT für 15 min. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend zweimal bei 13.000 U/min und RT für 6 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets luftgetrocknet und die DNA in 15 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Aufreinigung der restringierten Vorläufer-miRNA-Fragmente erfolgte gemäß den Herstellervorgaben. Zusammengefasst wurden die Proben mit 17 µl Bromphenolblau gemischt und auf 2 % Agarose-TAE-Gelen aufgetrennt. Auf einem UV-Sichtgerät wurden die Banden mit den Vorläufer-miRNAs ausgeschnitten. Die Banden wurden lysiert, durch Säulen gefiltert und gewaschen. Die Elution der DNA erfolgt in 15 µl RNase-freiem Wasser. Die Mengen des gefällten Vektors und der aufgereinigten Fragmente wurden anhand ihrer Banden auf 2 % Agarose-TBE-Gelen abgeschätzt. Die Lagerung der DNA-Lösungen erfolgte bei 4°C.

Am nächsten Tag wurden die Vorläufer-miRNA-Fragmente mithilfe der T4-DNA-Ligase in die restringierten Luciferase-Vektoren ligiert: in einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden Wasser, 2 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer, 1 µl der Luciferase-Reporterkonstrukte (ca. 60 ng), 4 µl der Vorläufer-miRNAs (ca. 20 ng) und 0,5 µl T4-DNA-Ligase gemischt und 1 h lang bei RT inkubiert. Die Transformation der kompetenten *E. coli* XL1-blue mit den ligierten Konstrukten folgte. Die Transformation unterschied sich in den folgenden Aspekten von der zuvor in diesem Kapitel beschriebenen Methode: Nach Resuspension der *E. coli*-Zellen in CaCl₂ wurden 100 µl kompetente Zellen zu den ligierten Proben hinzugefügt. Die anschließenden Inkubationsschritte auf Eis und bei 37°C wurden dreimal wiederholt. Das Ausstreichen der Suspensionen erfolgte auf je drei Agarplatten (100 µl, 200 µl und 300 µl), um Platten mit unterschiedlichen Bakteriendichten zu erhalten.

Am nächsten Tag wurden jeweils sechs Klone von den Platten entnommen und in 2 ml TY-Amp über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Isolation von DNA aus den Kulturen erfolgte mit dem Minilysat-Protokoll DNA. Für die Kontrollrestriktionen mit BcI und SgI wurden 9,5 µl Wasser, 3 µl ligierte DNA, 1,5 µl 10x Tango-Puffer, 0,5 µl SfaAI und 0,5 µl BcI gemischt und 1 h lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 2,5 µl Bromphenolblau gemischt und auf 1 % Agarose-TBE-Gelen aufgetrennt, um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen. Es folgte die Amplifikation erfolgreich klonierter Luciferase-Vorläufer-miRNA-Konstrukte in *E. coli* mit dem Nucleobond Xtra Midi EF-Kit. Zusammengefasst

wurden 3 µl der 2 ml Kulturen in 30 ml TY-Amp überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4.000 g geerntet und in 4 ml RES-EF resuspendiert, mit 4 ml LYS-EF lysiert und mit 4 ml NEU-EF neutralisiert. Es folgte die Inkubation der Lysate auf Eis und die Ladung auf equilibrierte Filter und Säulen. Die Filter wurden gewaschen und entfernt. Die Säulen wurden in zwei Schritten gewaschen und die DNA eluiert. Die Proben wurden mit Isopropanol ausgefällt bei 6.000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert, dann mit Ethanol gewaschen und bei 6.000 g bei RT für 5 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 200 µl H2O-EF resuspendiert. Die Plasmidkonzentrationen wurden spektrophotometrisch gemessen. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20°C.

4.6 ANALYSE DER GENOTYP-ABHÄNGIGEN PROZESSIERUNG VON VORLÄUFER-MICRORNAs

Prinzip des Luciferase-Assays für die Analyse der Genotyp-abhängigen miRNA-Prozessierung

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der kanonischen miRNA-Prozessierung ist die Spaltung der pri-miRNA in die pre-miRNA durch den Enzymkomplex Microprocessor [87]. Mehrere Sequenzmotive in der Haarnadel und in den flankierenden Regionen der pri-miRNAs können die Affinität von Microprocessor zur pri-miRNA beeinflussen (s. Kapitel 1.2). Der Effekt von SNPs mit MAFs > 1 % auf die Prozessierung der insgesamt elf ausgewählten miRNAs (s. Kapitel 4.2) wurde mit Luciferase-basierten Assays analysiert. Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 6 dargestellt.

Zur Messung der relativen Aktivität von Microprocessor in HeLa-Zellen wurde ein Assay basierend auf einem Dual-Luciferase-Reporter-System verwendet [153, 154]. Das Reporterkonstrukt kodiert für die GLuc als Reportergen und für eine sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) als interne Kontrolle für die Normalisierung. MiRNA-Vorläufer-Sequenzen wurden in die *Multiple Cloning Site* (MCS) zwischen dem GLuc-Gen und dem Poly(A)-Schwanz kloniert (s. Kapitel 4.5), sodass ein GLuc-pri-miRNA-Hybridgen entsteht. HeLa-Zellen wurden mit den Luciferase-Vorläufer-miRNA-Konstrukten transfiziert. In den Zellen wird aus dem Hybridgen ein Hybridtranskript erzeugt. Die pri-miRNA bildet dabei eine Haarnadelstruktur, die von endogenem Microprocessor erkannt werden kann. Nun können zwei verschiedene Situationen auftreten, wie in Abbildung 6 dargestellt.

Die Intensität des von der GLuc erzeugten Lumineszenzsignals korreliert mit der Affinität von Microprocessor zum pri-miRNA *stem-loop* und mit der Spaltungsrate. Eine höhere Affinität führt zu mehr Spaltung der pri-miRNA, weniger Luciferase und einem geringeren Lumineszenzsignal. Eine geringere Affinität führt zu einem höheren Lumineszenzsignal. Eine veränderte Effizienz der Microprocessor-Spaltung aufgrund einer Mutation in der pri-miRNA führt zu einem veränderten Lumineszenzsignal.

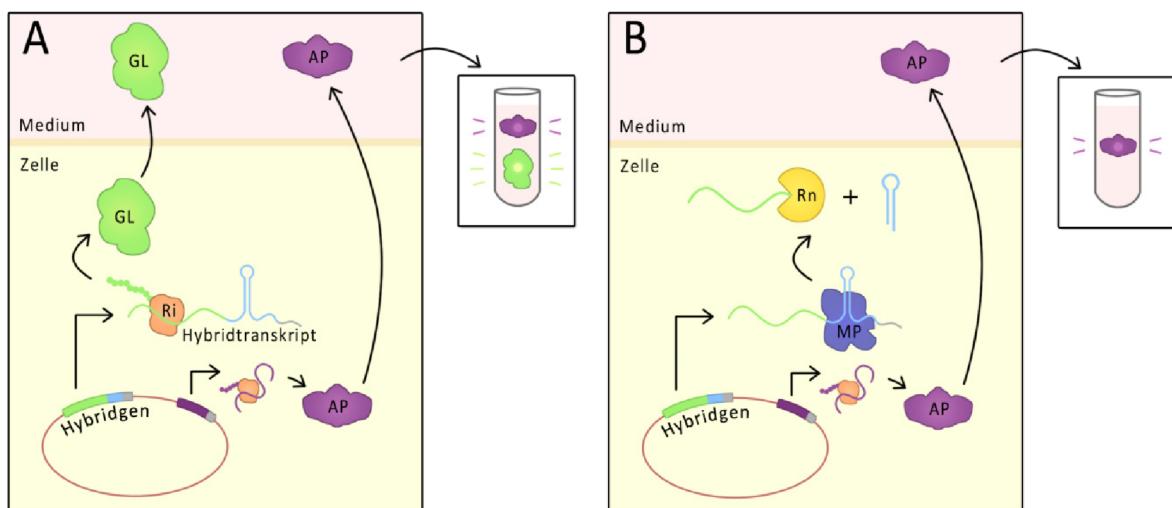


Abbildung 6: Prinzip des Assays zur Analyse auf eine Genotyp-abhängige miRNA-Prozessierung. Von den Luciferase-Vorläufer-miRNA-Konstrukten werden das GLuc-pri-miRNA-Hybridgen und das SEAP-Gen abgelesen. A) Wenn Microprocessor die pri-miRNAs an der Basis ihres *stem-loops* nicht spaltet, werden die Luciferase-Transkripte in Luciferase-Enzyme translatiert. Die Enzyme werden von der Zelle sezerniert. Für den Luciferase-Assay wird das Medium, das die sezernierten Enzyme enthält, entnommen. Nach Zugabe der Enzymsubstrate in das Medium werden die Substrate umgewandelt und ein starkes Lumineszenzsignal wird erzeugt, das mit einem Luminometer nachgewiesen werden kann. B) Wenn Microprocessor die pri-miRNA spaltet, werden sowohl die pri-miRNA als auch der Poly(A)-Schwanz am 3' Ende des Hybridtranskripts vom Luciferase-Transkript abgespalten. Dadurch bleibt das 3' Ende des Luciferase-Transkripts ungeschützt zurück und RNAsen können das Transkript abbauen. Für die Transkription in Luciferase-Enzyme steht weniger Luciferase-Transkript zur Verfügung. Bei der Durchführung des Luciferase-Assays werden weniger Luciferase-Substrate durch die Gaussia-Luciferase umgesetzt und schwächere Lumineszenzsignale nachgewiesen. AP = Alkalische Phosphatase; GL = Gaussia Luciferase; MP = Microprocessor; pri-miRNA = Primäre miRNA; Ri = Ribosom; Rn = RNase.

Transfektion von HeLa-Zellen

In Vorversuchen wurden die Eignung der Methode und die optimalen Bedingungen für die Transfektion der HeLa-Zellen und die Durchführung des Luciferase-Assays ermittelt. Die folgenden Luciferase-Konstrukte wurden verwendet:

- das Luciferase-Reporter-Plasmid ohne inserierte Vorläufer-miRNA als Negativkontrolle
- zwei Luciferase-Vorläufer-miRNA-Konstrukte mit der eingebrachten hsa-mir-16-1, eines mit einem C an der Position 3'(+19) der miRNA und eines mit einem T an dieser Stelle, als Positivkontrolle.

In 12-Well-Platten wurden pro Well je 90.000 HeLa-Zellen in 1,5 ml Medium ausgesät und für 24 h inkubiert. Die Lösungen für die Transfektion wurden bei RT aus jeweils 330 µl OPTI-MEM®I Medium,

22 μ l FuGENE® HD Transfektionsreagenz und 3,3 μ g Luciferase-(Vorläufer-miRNA-)Konstrukten angesetzt, gemischt und 10 min inkubiert. Die HeLa-Zellen wurden mit 10 μ l (100 ng DNA), 20 μ l (200 ng), 30 μ l (300 ng) und 50 μ l (500 ng) Transfektionsgemisch in drei biologischen Replikaten transfiziert. Nach 12 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach 24 h, 48 h und 72 h folgte die Durchführung der Luciferase-Assays.

Für die Analyse der Genotyp-abhängigen miRNA-Prozessierung der elf MS-assoziierten miRNAs wurden die HeLa-Zellen mit 20 μ l (200 ng DNA) bzw. 30 μ l (300 ng) Transfektionsgemisch in drei biologischen Replikaten transfiziert und die Luciferase-Assays nach 24 h und 48 h durchgeführt.

Luciferase-Assays

Die Luciferase-Assays wurden durchgeführt, um den Effekt der Mutationen auf die Prozessierung der miRNAs zu analysieren. Das Secret-E-Pair-Dual-Lumineszenz-Assay-Kit wurde nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Zusammengefasst wurden je zwei 50 μ l-Aliquots der Zellüberstände abgenommen und davon jeweils eins auf 65°C erhitzt. Es folgte die Vorbereitung der Substratlösungen für die beiden Reporterenzyme GLuc und SEAP. In 96-Well-Platten (OptiPlate) wurden je 10 μ l der Zellüberstände bzw. DMEM-basiertes Medium (Negativkontrolle) bzw. EF1A-PG04-Medium (Positivkontrolle) und 100 μ l der Substratlösungen vermischt; jeweils in technischen Duplikaten. Die Platten wurden inkubiert und die GLuc- und SEAP-Lumineszenzsignale bei einer Integrationszeit von 1 s mit einem GloMax-Multi-Detektionssystem gemessen (Promega).

Datenauswertung

Die Daten aus den Luciferase-Assays wurden in Microsoft Excel 2010 exportiert, in eine csv-Datei umgewandelt und anschließend mit der statistischen Softwareumgebung R (Version 4.0) eingelesen. In R wurden die GLuc-Signale auf die Signale der internen Standardkontrolle SEAP normalisiert, indem die Verhältnisse von GLuc zu SEAP berechnet wurden. Es erfolgte die Berechnung der mittleren GLuc/SEAP-Quotienten aller technischen und biologischen Replikate und der jeweiligen Standardabweichungen. Die Ergebnisse für die nicht-mutierten und mutierten Vorläufer-miRNAs wurden für die beiden Zeitpunkte und Plasmidmengen verglichen. Welch t-Tests für ungepaarte Proben wurden durchgeführt und p-Werte $< 0,05$ als Indikator für signifikante Unterschiede angesehen.

Zur Visualisierung der Daten wurden Säulendiagramme in R erstellt. Die mittleren GLuc/SEAP-Verhältnisse und Standardabweichungen 24 h und 48 h nach Transfektion mit 200 ng und 300 ng der jeweiligen Vorläufer-miRNAs und die p-Werte der einzelnen Vergleiche wurden aufgetragen. Signifikante Unterschiede wurden hervorgehoben.

4.7 MICRORNA ZIELGENANALYSE

Prinzip der microRNA Zielgenanalyse

Als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression binden miRNAs Transkripte mit komplementären Sequenzmotiven und führen zu deren Abbau bzw. Destabilisierung (s. Kapitel 1.2). Die Zielgene der MS-assoziierten miRNAs hsa-mir-199a-1 (rs1005039C), hsa-mir-934 (rs73558572G) und hsa-mir-4423 (rs817478C), für die eine SNP-abhängige Prozessierung gezeigt werden konnte (s. Kapitel 5.2), wurden untersucht. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit Vorläuferplasmiden zur Überexpression der miRNAs und mit dem *scrambled*-Kontrollplasmid transfiziert. Das Kontrollplasmid enthält eine *scrambled* pre-miRNA-Sequenz. Mittels Echtzeit quantitativer PCR (qPCR) wurde die Transfektionseffizienz überprüft. Durch RNA-Profilung wurde auf Transkripte, die in den mit den Vorläufer-miRNAs transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle niedriger exprimiert sind, gescreent.

Für das RNA-Profilung wurden Clariom D-Microarrays eingesetzt; hochauflösende Arrays, die die Expression von > 130.000 Protein-kodierenden und nicht-Protein-kodierenden Genen (Synonym: Transkript-Cluster) messen. Die Transkript-Cluster umfassen > 540.000 menschliche Transkripte und > 480.000 Exon-Exon Junctions. Auf einem Array sind mehr als 6.700.000 Oligonukleotid-Sonden in einem Gittermuster fixiert, um die > 130.000 Transkript-Cluster abzudecken. Den 25 Basen langen Sonden liegen Transkript-Annotationen aus verschiedenen Datenbanken wie Ensembl, NONCODE, UCSC Genes und aus einzelnen Publikationen zugrunde.

Transfektion von HeLa-Zellen

In 6-Well-Platten wurden pro Well 200.000 HeLa-Zellen in 3 ml Medium ausgesät und für 24 h inkubiert. Jeweils 18 µg Vorläufer- bzw. Kontrollplasmid, 900 µl OptiMEM und 60 µl FuGENE wurden gemischt. Die Transfektion von je sechs Wells erfolgte mit 150 µl (2 µg) der jeweiligen Plasmidlösungen.

RNA-Extraktion

Die HeLa-Zellen wurden 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion mit dem miRNeasy-Minikit nach den Anweisungen des Herstellers lysiert. Zusammengefasst wurden die Zellen in 700 µl Lysepuffer aufgenommen, homogenisiert und bei -20°C gelagert. Die aufgetauten Proben wurden mit 140 µl Chloroform gemischt und bei 12.000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die oberen wässrigen Phasen wurden in neue Röhrchen überführt und absoluter Ethanol hinzugefügt. Die Proben wurden gemischt und in RNeasy® Mini-Säulen überführt. Die Zentrifugation der Säulen verlief bei 8.000 g und RT für 15 s. Die Filtrate wurden nochmals auf die Säulen gegeben, ein weiteres Mal für 15 s zentrifugiert und

für 1 min trockenentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden je 40 µl DEPC-behandeltes Wasser auf die Säulen gegeben, 1 Minute lang bei RT inkubiert und bei 8.000 g und RT für 1 Minute zentrifugiert. Die Filtrate wurden wieder auf die Säulenmembranen übertragen und ein weiteres Mal zentrifugiert. Die Messung der RNA-Konzentrationen der Proben erfolgte mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer und dem Programm RNA-40. Als Blindprobe wurde 1 µl DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Bestimmung der RNA-Integrität

Zur Bestimmung der RNA-Integrität der RNA-Isolate wurden die Proben an die Core Facility für Micro-Array-Technologie übergeben. Dort wurde eine automatisierte Kapillarelektrophorese mit dem RNA 6000 Nano-Kit und dem 2100 Bioanalyzer durchgeführt. Das Nano-Kit eignet sich für die Analyse von RNA mit Konzentrationen von 25 – 500 ng/µl. Mit dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte RNA-Fraktionen wie ribosomale 18S- und 28S-RNA, mRNA und fragmentierte RNA anhand ihrer Größe aufgelöst und auf einem Elektropherogramm sowie auf einem virtuellen Gelbild visualisiert. Die automatisch berechnete RNA-Integritätszahl (RIN) beschreibt die Integrität der RNA auf einer Skala von 1 bis 10, wobei eine RIN von 1 vollständig degradierte RNA beschreibt [155]. Für die weitere Analyse wurden Proben mit einer RIN von ≥ 7 genutzt.

Bestimmung der microRNA-Expression nach der Transfektion

Das TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit, TaqMan® miRNA Assays für hsa-miR-199a-3p und -5p, hsa-miR-934-5p, hsa-miR-4423-3p und -5p sowie hsa-miR-191-5p und der TaqMan™ Universal Mastermix II, mit UNG, wurden genutzt, um die reifen miRNA-Moleküle in den RNA-Lysaten in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben und die überexprimierten miRNAs relativ zur endogen exprimierten hsa-miR-191-5p als Referenz-miRNA zu quantifizieren [156, 157]. Reife miRNA-Moleküle sind mit einer Länge von ca. 22 nt zu kurz für eine klassische reverse Transkription und qPCR mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern. Daher wurden für die TaqMan® miRNA Assays miRNA-spezifische *stem-loop*-Primer verwendet, welche zur Bildung von verlängerten cDNA-Molekülen führen. Diese sind lang genug, dass für die qPCR ein miRNA-spezifischer Vorwärtsprimer, ein Rückwärtsprimer, der an die *stem-loop* Primer-Sequenz bindet, und eine spezifische sogenannte *probe*, an die ein Reporter-Farbstoff und ein *Quencher*, welcher das Farbsignal inhibiert, gekoppelt sind, eingesetzt werden können. Während der Elongation wird der Farbstoff von der *probe* abgespalten und das Farbsignal kann detektiert werden [158].

Alle Schritte wurden entsprechend den Herstellerangaben für TaqMan® Small RNA Assays in 96-Well-

Platten durchgeführt. Für die Reverse Transkription wurden 10 ng RNA eingesetzt und das GeneAmp® PCR System 9700 genutzt. Die qPCR erfolgte am ViiA 7 und mit 45 PCR-Zyklen. Für alle Assays wurde als Reporter "FAM" und als Quencher "NFQ-MGB" ausgewählt. Die Daten wurden als eds-Dateien exportiert.

Die Auswertung der qPCR erfolgte in der ExpressionSuite Software. In der Software wurden verschiedene Qualitätsparameter und die C_T -Werte (*cycle threshold*) für die einzelnen Moleküle automatisch bestimmt. Der C_T -Wert ergibt sich aus dem Amplifikationszyklus, bei dem das Signal die Schwelle zum Hintergrundsignal überschritten hat. Je niedriger der C_T -Wert, desto höher war die anfänglich vorhandene Menge des untersuchten DNA-Fragments in der Probe. Außerdem wurden die ΔC_T -Werte aus der Differenz der C_T -Werte der MS-assozierten miRNAs und der endogenen hsa-miR-191-5p automatisch berechnet. Es erfolgte der Export der Ergebnisse als csv-Datei. Für Moleküle, die innerhalb von 45 PCR-Zyklen nicht nachgewiesen werden konnten, wurde sowohl für den C_T - als auch für den ΔC_T -Wert „NA“ angegeben. Für die MS-assozierten miRNAs in den verschiedenen Ansätzen wurden die mittleren ΔC_T -Werte und ihre Standardabweichungen berechnet.

Transkriptomprofiling

Das RNA-Profiling mit Clariom D-Microarrays wurde von der Core Facility für Micro-Array-Technologie durchgeführt. Als Input für den *whole transcript* Assay wurden je 210 ng isolierte RNA aus den HeLa-Zellen verwendet. Die Vorbereitung der RNA-Proben erfolgte mit dem GeneChip™ WT PLUS Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die RNA wurde in *single-stranded same-strand* DNA transkribiert, fragmentiert, mit Biotin gelabelt und auf dem Microarray inkubiert. Kontrollfragmente zur Qualitätsbeurteilung wurden mitgeführt. Die *single-stranded sense-strand* DNA-Fragmente und Kontrollen hybridisieren mit komplementären Oligonukleotid-Sonden auf dem Array. Die hybridisierten Fragmente werden angefärbt, was zu einem Fluoreszenzsignal führt, welches mit einem Scanner detektiert wird. Die Scans wurden als jpg-Dateien und als cel-Dateien gespeichert.

Qualitätskontrolle & Datennormalisierung

Der erste Schritt bei der Qualitätskontrolle der Microarrays war die visuelle Inspektion der jpg-Dateien. Sichtbare Flecken auf den Scans können auf Luftblasen auf den Arrays während der Hybridisierung hinweisen. Scans mit großen Flecken wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die cel-Dateien, welche Daten für mehr als 6.700.000 Oligonukleotidsonden pro Array beinhalten, wurden mit der Software Transcriptome Analysis Console (TAC) Version 4.0.2 analysiert. Der Algorithmus der TAC-Software normalisiert die Daten mit der SST-RMA-Methode und führt statistische Vergleiche zwischen den Expressionsniveaus der > 130.000 Transkript-Cluster in den verschiedenen Proben durch. Die

Normalisierung umfasst eine Hintergrundkorrektur, eine Quantilnormalisierung und eine log2-Transformation der Signalintensitäten. Die Standardeinstellungen für die Datenverarbeitung und die Identifizierung von differentiell exprimierten Transkripten wurden, wie im nachfolgenden Abschnitt näher erläutert, beibehalten.

Folgende Qualitätskontrollparameter wurden in der TAC-Software überprüft: **1)** die Signalintensitäten der Hybridisierungs-, Positiv- und Negativkontrollen wurden beurteilt, **2)** die Verteilung der Rohsignalintensitäten der einzelnen Scans wurde bewertet und **3)** mit der Hauptkomponenten-analyse (*principal component analysis, PCA*) wurde untersucht, ob Ausreißer in den Microarray-Daten vorliegen.

Datenauswertung

Die Mittelwerte der Expressionsniveaus der Transkripte in den Vergleichsgruppen wurden in TAC mit der Tukey-biweight Methode, welche besonders robust gegenüber Ausreißern ist, berechnet und in log2-Skalierung angegeben. Es erfolgte der Vergleich der Transkriptionsniveaus in den HeLa-Zellen, in denen die jeweiligen miRNAs überexprimiert wurden, mit denen, die mit dem *scrambled*-Kontrollplasmid transfiziert wurden. Es erfolgten separate Vergleiche für die Proben, die 24 h nach der Transfektion lysiert wurden, und für die Proben, die nach 48 h lysiert wurden. Da miRNAs ihre Zielgene inhibieren, wurden niedriger exprimierte Transkripte (im Vergleich zur Kontrolle) als potentielle Zielgene der miRNAs betrachtet. Die Auswahl differentiell exprimierter Transkripte beruhte auf der Grundlage von zwei Kriterien:

- A) Niedriger exprimierte Transkripte mit einem *fold change (fc)* von $\leq -1,5$ zu mindestens einem der beiden Zeitpunkte und Herunterregulation mit einem *fc* von ≤ -1 zum anderen der beiden Zeitpunkte. Negative *fc*s weisen auf eine Herunterregulation hin. Ein *fc* von -1,5 entspricht einer Herunterregulierung eines Gens um 33,3 %.
- B) P-Werte von $\leq 0,05$. Die p-Werte wurden in TAC berechnet. Die Berechnung beruht auf dem R-Paket „*limma*“ und damit auf einem linearen Modell [159]. Die differentielle Expression von Transkripten wird basierend auf einer Variante des t-Tests beurteilt.

Die Transkripte, die nach der Überexpression der jeweiligen miRNAs in HeLa-Zellen entsprechend der Kriterien niedriger exprimiert waren, wurden als potentielle Zielgene der miRNAs angesehen, in Genlisten gespeichert, als txt-Dateien exportiert und in Excel-Tabellen konvertiert.

Analyse der potentiellen Zielgene

Einige der differentiell exprimierten Transkripte, die durch das Transkriptomprofiling ermittelt

wurden, können auf Messungenauigkeiten und Sekundäreffekte zurückzuführen sein. Daher wurden die gefilterten Gene priorisiert, um die Transkripte auszuwählen, die am wahrscheinlichsten direkte Ziele der miRNAs sind:

1. Transkripte mit offiziellen HGNC-Gensymbolen, die laut HGNC Protein-kodierend sind, wurden priorisiert.
2. Das Online-Tool RNAhybrid [160] wurde verwendet, um das potentielle Vorhandensein direkter miRNA-Ziel-Interaktionen *in silico* zu bewerten.

Die Datenbank HGNC (<https://www.genenames.org/>) ist die Standard Referenzdatenbank für die Nomenklatur menschlicher Gene. Mit RNAhybrid kann eine thermodynamische Abschätzung für die Hybridisierungsenergie (mfe, minimale freie Energie) der Bindung einer miRNA und einer Zielsequenz berechnet werden. Je niedriger die mfe, desto stärker ist die vorhergesagte molekulare Wechselwirkung. Für die RNAhybrid-Analysen wurden sowohl die miRBase-gelisteten 5p- und 3p-miRNAs sowie die IsomiRs, wie in Kapitel 4.11 beschrieben, als miRNA-Sequenzen eingelesen. Die 3' UTR-Sequenzen der herunterregulierten Protein-kodierenden Transkripte wurden im FASTA-Format aus dem BioMart-Portal der Ensembl-Datenbank (Release 101) extrahiert [161] und als Zielsequenzen in RNAhybrid eingelesen. Die folgenden Einstellungen wurden gegenüber den Standardeinstellungen von RNAhybrid modifiziert: Energieschwelle: -15; *compact output* wurde angewählt; eine Helixbeschränkung für die miRNAs von Position 2 bis 7 wurde festgelegt. Letztere diente dazu, die Ergebnisse auf 3' UTRs zu beschränken, die mit der seed-Sequenz der miRNAs hybridisieren. Der Export der Ergebnisse als txt-Dateien und die Konversion in Excel-Tabellen erfolgte. Zur Visualisierung der Daten wurden Kreisdiagramme mit dem Online-Tool Meta-Chart (<https://www.meta-chart.com/>) erstellt.

Für Zielgenlisten mit mehr als 50 Zielgenen wurden Enrichmentanalysen mit den Webtools von Reactome (Version 75) [162] und Enrichr [163, 164] durchgeführt. Die top 5 Signalwege in Reactome, anhand der Anzahl der zugeordneten Gene, wurden ermittelt. Die Analyse der Anreicherung der Zielgene in Signalwegen (KEGG 2019 Human, WikiPathways 2019 Human) und Gen-Ontologien (GO Biological Process 2018 & GO Molecular Function 2018) erfolgte mit Enrichr. Dabei wurde ebenfalls jeweils die top-Genkategorie nach Anzahl der Zielgene ermittelt. Die Extraktion der Funktionen von Genen, welche nicht durch die Enrichmentanalysen aufgezeigt wurden, erfolgte aus der Datenbank OMIM [165]. Weiterhin wurde überprüft, ob die priorisierten Transkripte bereits in der Datenbank miRTarBase [118] als Ziele der miRNAs eingetragen oder in miRWalk 3.0 [119] durch den zugrundeliegenden Algorithmus als Ziele vorhergesagt sind. Für die miRWalk-Analysen wurden die Standardeinstellungen genutzt und auf vorhergesagte Interaktionen mit den 3'UTRs der Zielgene gefiltert.

4.8 BLUTPROBENSAMMLUNG

Blutentnahme & Studienkohorten

Für die Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe für Neuroimmunologie, zu denen unter anderem die vorliegende Arbeit zur Analyse der MS-assoziierten miRNAs in B-Zellen von MS-Patienten und gesunden Kontrollen zählt, wurden Blutproben von sechs Kohorten/Gruppen entnommen:

- A) RRMS-Patienten unmittelbar vor der ersten Behandlung mit einer IRT,
- B) RRMS-Patienten unter Behandlung mit Alemtuzumab,
- C) RRMS-Patienten, die mit Natalizumab behandelt wurden,
- D) RRMS-Patienten unter Behandlung mit Cladribin,
- E) PPMS-Patienten und
- F) gesunde Kontrollen

Bei allen Patienten wurde MS nach den revidierten McDonald-Kriterien von 2017 [54] diagnostiziert. Die Behandlung der Patienten einschließlich Diagnose und Überwachung folgte ausschließlich der ärztlichen Praxis. Das Alter und das Geschlecht der Patienten und Gesunden und die Erkrankungsdauer sowie der EDSS zum Zeitpunkt der Blutentnahme, die Anzahl der Schübe im Vorjahr und die Therapiegeschichte wurden erfasst. Vor der Blutentnahme erfolgten die Aufklärung der Teilnehmer und die Einholung ihrer schriftlichen Einwilligung. Alle Untersuchungen der Blutproben wurden von der Ethikkommission der Universität Rostock bewilligt (Ethikvotum: A 2016-0188) und in Übereinstimmung mit den Richtlinien für gute klinische Praxis und in Übereinstimmung mit den ethischen Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Datenschutzbestimmungen wurden zu jedem Zeitpunkt eingehalten. Pro Studienteilnehmer wurden 20 ml peripheres Blut mittels Venenpunktion und in EDTA-Röhrchen entnommen. Der Transport der unbehandelten Blutproben von der Klinik zum Labor erfolgte in Kühlpackungen (2 – 8°C).

Extraktion von DNA

DNA wurde aus 200 µl Vollblut mit dem QIAamp DNA blood mini kit nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Zusammengefasst wurden Protease, Vollblut und Puffer gemischt und bei 56°C für 10 min inkubiert. Der Mischung wurde Ethanol (99 %) zugesetzt und das Lysat durch eine Säule filtriert und in mehreren Schritten gewaschen. Die Säulen-gebundene DNA wurde in 200 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

Isolation und Lagerung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Das restliche Blut wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt und

mittels Gradientenzentrifugation auf Ficoll-Basis bei 450 g und 4°C für 30 min phasensepariert. Die Überführung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) in der Interphase des Zentrifugats in 15 ml-Röhrchen folgte. Die Zellen wurden mit bis zu 15 ml PBS verdünnt und durch Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 10 min gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Laupuffer (RuBu, *running buffer*) resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer und unter Zugabe von Trypanblau wurden die lebenden Zellen gezählt. Zur Kryokonservierung wurden 2×10^6 PBMC bei 300 g und RT für 5 min zentrifugiert, in 2 ml biofreeze Kryokonservierungsmedium resuspendiert und zwei Aliquots in Kryokonservierungsröhrchen überführt. In CoolCell-Behältern wurden die Proben mit einer Geschwindigkeit von 1°C pro Minute auf -80°C eingefroren, bevor sie in einem Flüssigstickstofftank gelagert wurden.

Isolation und Lagerung von B-Zellen

Die Isolation der B-Zellen aus den verbleibenden PBMC erfolgte mit Hilfe eines negativen Selektionsansatzes mit dem autoMACS Pro-Separator. Die Selektion wurde mit dem Pan-B-Zell-Isolationskit für Menschen nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Zusammengefasst wurden die PBMC mit einem Antikörpermisch markiert, das gegen alle Blutzellen mit Ausnahme der B-Zellen gerichtet ist. Die Antikörper sind mit magnetischen Microbeads gekoppelt. Die Zellen wurden mit einem magnetischen Zellseparator und mit dem Programm „Depletes“ sortiert. Nach der Trennung ergaben sich zwei Zellsuspensionen: eine mit der negativen Fraktion, die hauptsächlich aus B-Zellen besteht, und die andere mit der positiven Fraktion mit allen festgehaltenen Zellen (nicht-B-Zellen). Die lebenden Zellen der beiden Fraktionen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Reinheit der Zellen wurde mit dem BD FACSCalibur überprüft. Jeweils 15 µl der Fraktionen wurden mit den folgenden Antikörpern markiert: 2 µl anti-CD19-FITC oder anti-CD20-FITC, 1 µl anti-CD3-PerCP und 0,67 µl anti-CD14-PE; und 3 µl Fc *blocking reagent* wurden hinzugefügt, um unspezifischen Bindungen entgegenzuwirken. Die markierten Zellen wurden bei RT und im Dunkeln für 10 min inkubiert, mit 700 µl RuBu gewaschen, bei 300 g und RT für 5 min zentrifugiert und in 200 µl RuBu resuspendiert, bevor sie im FACSCalibur analysiert wurden. Die Bestimmung des Anteils der CD19⁺ bzw CD20⁺ Zellen erfolgte in einem Gate, das Debris ausschloss. Zur Kryokonservierung wurden 2×10^5 B-Zellen zentrifugiert, in 2 ml Kryokonservierungsmedium resuspendiert und in zwei Aliquots in Kryokonservierungsröhrchen überführt. Die Proben wurden in CoolCell-Behältern auf -80°C eingefroren und in einem Flüssigstickstofftank gelagert.

Extraktion von RNA aus B-Zellen

Die verbleibenden B-Zellen wurden durch Zentrifugation bei 300 g und RT für 5 min pelletiert. Die Lyse

der Zellen erfolgte in 700 µl QIAzol-Lysereagenz (QIAGEN miRNeasy Mini Kit) und auf Eis. Die lysierten Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Nach Abschluss aller Blutprobenentnahmen wurden die Zelllysate der Core Facility für Micro-Array-Technologie übergeben. Dort erfolgte die Extraktion der RNA mit dem QIAGEN miRNeasy Mini Kit und dem RNase-free DNase Set gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer und dem Programm RNA-40 gemessen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

4.9 GENOTYPISIERUNG VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN

Genotypisierung

Die aus den Blutproben extrahierte DNA wurde in Hinblick auf die Genotypen von 24 ausgewählten SNPs analysiert (s. Tabelle 1). Für Studienteilnehmer, von denen mehrere Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden, erfolgte die Analyse einer DNA-Probe. Es wurden Customized Specialty TaqMan® Array Karten für die SNP-Genotypisierung verwendet. Auf den 384-Well-Karten können je acht DNA-Proben analysiert werden, was die Genotypisierung von 48 SNPs für jede der Proben ermöglicht. Die restlichen 24 SNPs auf den Array Karten waren Teil anderer Studien. In jedem Well sind sequenzspezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer und zwei allelspezifische TaqMan® *minor groove binder probes*, die mit VIC® bzw. FAM™ Farbstoff markiert sind, präplattiert. Für jeden SNP können auf diese Weise beide Allele detektiert werden.

In der vorliegenden Studie wurden 13 SNPs innerhalb der miRNA-kodierenden Regionen, neun nahegelegene MS-assoziierte *lead* SNPs (aus [36]) und zwei HLA *tag* SNPs analysiert. Der SNP mit dem Identifier rs2844821 gilt als *tag* SNP für HLA-A*02:01 [42] und rs3135388 gilt als *tag* SNP für HLA-DRB1*15:01 [41]. Der SNP rs116807677 wurde ersatzweise für rs77896647 in der hsa-mir-4464-kodierenden Sequenz ausgewählt, da das Assaydesign für rs77896647 nicht möglich war; die beiden SNPs jedoch in perfektem LD ($D' = 1$ und $r^2 = 1$ laut Ldpair-Analyse mit allen Populationen) sind.

Die qPCR-Analysen wurden gemäß der Anleitung des Herstellers für TaqMan® Gene Expression Assays-TaqMan® Array Cards durchgeführt. Von jeder Probe wurden 200 ng genomische DNA jeweils mit dem TaqMan® Universal Master Mix II, mit UNG, gemischt und in die Lanes der Array Karten pipettiert. Es erfolgte die Zentrifugation und Versiegelung der beladenen Karten. Mit dem ViiA 7 wurden 40 qPCR-Zyklen gefahren. Die Daten wurden als eds-Dateien exportiert.

Tabelle 1: Identifier und chromosomale Positionen der für die Genotypisierung ausgewählten SNPs

SNP Identifier (dbSNP 151)	Kategorie	Chromosomenposition (hg38)	TaqMan Assay ID
rs1005039	MIR SNP	Chr19:10817405	C_8726579_20

MATERIALIEN UND METHODEN

rs116807677 ¹	MIR SNP	Chr6:90310832	C_151236210_10
rs1414273	MIR SNP	Chr1:116560027	AH705MS
rs2003071	MIR SNP	Chr1:6429806	ANYMVD6
rs41292017	MIR SNP	Chr12:57824599	C_86509578_10
rs521188	MIR SNP	Chr1:65057836	C_68570_10
rs73558572	MIR SNP	ChrX:136550886	ANWC69C
rs77905262	MIR SNP	Chr12:123010733	C_101749836_10
rs779704489	MIR SNP	Chr5:134225868	ANXGZT9
rs78351440	MIR SNP	Chr12:123010742	C_101749837_10
rs7926599	MIR SNP	Chr11:118910821	C_189535191_10
rs80063010	MIR SNP	Chr6:90312697	C_100547928_10
rs817478	MIR SNP	Chr1:85133880	C_8864209_10
rs12365699	MS <i>lead</i> SNP	Chr11:118872577	C_31035659_10
rs12609500	MS <i>lead</i> SNP	Chr19:11063252	AN476NV
rs244656	MS <i>lead</i> SNP	Chr5:134114136	C_2949966_10
rs2807267	MS <i>lead</i> SNP	ChrX:136584294	C_26154921_10
rs2986736	MS <i>lead</i> SNP	Chr1:6452487	C_16188318_10
rs6589706	MS <i>lead</i> SNP	Chr11:118877104	C_32984267_10
rs701006	MS <i>lead</i> SNP	Chr12:57713053	C_189233138_10
rs72928038	MS <i>lead</i> SNP	Chr6:90267049	C_97128303_10
rs7975763	MS <i>lead</i> SNP	Chr12:123119506	AN7DY9T
rs2844821	HLA <i>tag</i> SNP	Chr6:29870865	C_26544998_10
rs3135388	HLA <i>tag</i> SNP	Chr6:32445274	C_27464665_30

Für die vorliegende Studie wurden 24 SNPs genotypisiert. Davon liegen 13 SNPs innerhalb von miRNA-kodierenden Regionen (MIR SNPs). Bei neun SNPs handelt es sich um MS-assoziierte *lead* SNPs (aus [36]) und bei zwei weiteren um HLA *tag* SNPs. Der SNP rs116807677 wurde ersatzweise für rs77896647 ausgewählt. HLA = Humane Leukozytenantigene; SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus.

Datenauswertung

Die Bestimmung der Genotypen für die 24 SNPs in den DNA-Proben erfolgte automatisiert in der TaqMan Genotyper Software 1.6. Die Zuordnungen wurden manuell anhand der generierten *Allelic Discrimination*-Plots und der Amplifikationskurven überprüft. In den *Allelic Discrimination*-Plots für die jeweiligen SNPs sind für jede Probe die FAM- gegen die VIC-Signale aufgetragen. Hohe Werte auf der VIC-Skala und niedrige Werte auf der FAM-Skala liegen vor, wenn die DNA homozygot für das Allel ist, das durch VIC markiert wurde. Entsprechendes gilt für den anderen homozygoten Genotyp. Hohe Werte auf beiden Skalen zeigen den heterozygoten Genotyp an. Die Speicherung der *Allelic Discrimination*-Plots als png-Dateien erfolgte. Die Ergebnisse der Analyse wurden als txt-Datei gespeichert und in Microsoft Excel importiert. In einer neuen Excel-Tabelle wurden die 24 SNPs gegen die untersuchten DNA-Proben aufgetragen, die Allele den VIC- und FAM-Farbstoffen zugeteilt, die MS-Risikoallele laut der GWAS-Studie von 2019 [36] definiert und die Allelfrequenzen laut dbSNP 151 notiert.

Für alle SNPs wurden die Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten für die MS-Patienten und Kontrollen in der gesamten Studienkohorte berechnet. Auf Basis der Anzahl der Allele in den Gruppen der MS-Patienten und der Kontrollen wurden die ORs nach der Wald-Methode als Maß für die Assoziation der Risikoallele mit MS berechnet. In R erfolgte die Ermittlung der p-Werte mit dem Fisher-Test und unter der Hypothese, dass das OR > 1 liegt. Für HLA-A*02:01 (getagged durch rs2844821), bei dem es sich um ein protektives Allel handelt [42], wurde der Fisher-Test unter der Hypothese, dass OR < 1 liegt, durchgeführt. Für X-chromosomal SNPs erfolgte die Berechnung getrennt für Männer und Frauen. P-Werte < 0,05 wurden dabei als Indikatoren für signifikante Assoziationen betrachtet.

4.10 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG VON B-ZELLEN

Prinzip der durchflusszytometrischen Analyse von B-Zellen

Die Reinheit und die Subpopulationen von B-Zellen wurden anhand ihrer Größe, Granularität und Zelloberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert. Das für die Studie verwendete BD FACSAria™ Illu besteht aus einem optischen System mit vier Lasern mit Anregungswellenlängen von 633 nm (rot), 561 nm (gelb-grün), 488 nm (blau) und 405 nm (violett). Im Fluidiksystem des Zytometers wird die Zellsuspension durch eine Hüllflüssigkeit fokussiert und singularisiert. Die einzelnen Zellen durchlaufen die Laserstrahlen und streuen das Licht. Entlang des Weges des Lasers wird die Vorwärtsstreuung (FSC) detektiert, was die Unterscheidung der Zellen nach ihrer Größe ermöglicht. Es können drei FSCs unterschieden werden: FSC-A für die Fläche des Signals, FSC-H für die Höhe und FSC-W für die Breite. Orthogonal zum Laser wird die Seitwärtsstreuung (SSC), ebenfalls als SSC-A, SSC-H und SSC-W, detektiert, welche Informationen über die Granularität der Zellen liefert. Mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen Zelloberflächenmoleküle können Zellen weiter charakterisiert werden. Bei Anregung des Fluorochroms durch die jeweilige Wellenlänge emittiert es Licht seines Emissionsspektrums. Dieses wird durch Spektralfilter und zu Detektoren geleitet. Die Intensität des detektierten Signals gibt Aufschluss über die relative Menge der Moleküle, gegen die die Fluorochrom-konjugierten Antikörper gerichtet sind. Wenn mehr als ein Fluorochrom verwendet wird, können sich deren Emissionsspektren teilweise überlappen. Diese spektrale Überlappung kann durch eine mathematische Methode, die Fluoreszenzkompensation, korrigiert werden. Hierfür muss mit einer einfach gefärbten Probe (Kompensationskontrolle) der relative Beitrag der einzelnen Fluorophore zum detektierten Signal bestimmt werden. In einer geeigneten Software werden die Spillover-Werte aus den Spektren der anderen Fluorochrome berechnet und vom Signal subtrahiert.

Die für die Studie entnommenen kryokonservierten B-Zellen wurden aufgetaut und mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt, die gegen CD19 (B-Zell-Marker) und verschiedene Marker zur Identifizierung von B-Zell-Subpopulationen gerichtet waren (s. Tabelle 2). Zusätzlich wurden die

B-Zellen mit Zombie Green™ gefärbt, einem aminreaktiven Fluoreszenzfarbstoff, der nur für Zellen mit geschädigten Membranen durchlässig ist und die Unterscheidung in lebend und tot ermöglicht.

Auftauen von B-Zellen

Die zwei Röhrchen mit insgesamt 2×10^5 kryokonservierten B-Zellen aus den jeweiligen Blutproben wurden schnell bei 37°C aufgetaut. Die Überführung der frisch aufgetauten Zellen in 6 ml PBS in 15 ml Röhrchen erfolgte. Die Kryoröhrchen wurden mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellsuspensionen wurden bei 330 g und bei RT für 10 min zentrifugiert.

Färbung von B-Zellen

Der vorgewärmte Zombie Green™ Farbstoff wurde in 100 µl DMSO rekonstituiert und 1:1000 in PBS verdünnt. Die Resuspension der B-Zellen in 100 µl verdünnter Zombie Green™-Lösung und die Inkubation für 15 min bei RT im Dunkeln erfolgte. Die Zellsuspensionen wurden mit 2 ml RuBu gewaschen. FcR *blocking reagent* wurde verwendet, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren zu blockieren. Die Verdünnung des Reagens erfolgte 1:250 in PBS. Die B-Zellen wurden in 100 µl verdünntem FcR *blocking reagent* resuspendiert und für 10 min bei 8°C inkubiert. Zur Phänotypisierung wurde den B-Zellen ein Gemisch aus den folgenden Antikörpern zugesetzt: 1 µl verdünntes IgD-BV750 (1:20 in RuBu), 1 µl CD19-PerCP, 1 µl CD27-PE, 1 µl CD38-PE/Dazzle594, 1 µl CD23-BV421, 0,4 µl CD24-APC-Vio770 und 0,4 µl CD21-APC. Die Proben wurden auf Eis und im Dunkeln 20 min lang inkubiert, mit 1 ml RuBu gewaschen und in 200 µl RuBu resuspendiert.

Durchflusszytometrische Analyse

Die gefärbten B-Zell-Proben wurden mit dem BD FACSAria™ Illu unter Verwendung der BD FACSDiva™ Software v.8.0.2 und in Zusammenarbeit mit der Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse der Universitätsmedizin Rostock charakterisiert. Die kompletten Zellsuspensionen wurden für die Analysen genutzt. Als interne Kontrolle wurden bei jedem Lauf 2×10^6 gepoolte und gefärbte PBMC aus gesunden Studienteilnehmern mitgeführt. Die Volumina der Färbemischungen wurden entsprechend hochskaliert. Die Emissionsspektren der angeregten Fluorochrome wurden wie in Tabelle 2 angegeben gefiltert. Die Kompensation erfolgte mit der BD FACSDiva™ Software v.8.0.2. Die bei der zytometrischen Analyse erzeugten fsc-Dateien wurden exportiert.

Tabelle 2: Spezifikation des Durchflusszytometrie-Panels

Konjugiertes Fluorochrom	Antikörper-Ziel	Laser	Filter
APC	CD21	633 nm	660/20 nm
APC-Vio770	CD24	633 nm	780/60 nm, 735 <i>long pass</i>

BV421	CD23	405 nm	450/40 nm
BV750	IgD	405 nm	750/30 nm, 740 <i>long pass</i>
PE	CD27	561 nm	582/15 nm
PE/Dazzle594	CD38	561 nm	610/20 nm, 600 <i>long pass</i>
PerCP	CD19	488 nm	695/40 nm, 655 <i>long pass</i>
Zombie Green™	-	488 nm	530/30 nm, 502 <i>long pass</i>

Datenauswertung

Die Auswertung der Dateien erfolgte in FlowJo Version 10. Zur Normalisierung und Qualitätsprüfung der Daten wurden die FlowJo-Plugins CytoNorm Version 0.9 und FlowAI Version 2.1 eingesetzt. CytoNorm ist ein Algorithmus zur Normalisierung von Batch-Effekten für kombinierte Analysen [166]. Batch-Effekte können durch Variationen in der Probenvorbereitung und geräteabhängige Effekte verursacht werden. Der CytoNorm-Algorithmus gleicht die PBMC-Kontrollproben an, die mit jeder Charge mitgeführt wurden. Diese Korrektur wird auf alle Dateien in den jeweiligen Chargen angewandt. Der Satz von Dateien mit Batch-Effekt-Korrekturen wurde exportiert. FlowAI ist ein Werkzeug zur Überprüfung der Datenqualität [167]. Für alle Proben wird die Stabilität der Flussrate und der Signalerfassung über die Zeit geprüft. Eine Zusammenfassung der Qualitätsbewertung wird erstellt und Anomalien und Ausreißer außerhalb der statistischen Norm werden entfernt. Auf diese Weise können Unterschiede in der Probenqualität zurückverfolgt und reduziert werden.

Die Analyse der B-Zell-Phänotypen erfolgte mit den normalisierten und bereinigten Daten. Eine mehrstufige Gating-Strategie wurde angewandt, um aus allen detektierten Ereignissen lebende einzelne CD19⁺ Zellen herauszufiltern [168]:

1. SSC-A gegen FSC-A: Ausschluss von Ereignissen mit kleinem FSC-A (Debris-Ausschluss)
2. FSC-H gegen FSC-W: Ausschluss von Zell-Dupletten im FSC
3. SSC-H gegen SSC-W: Ausschluss von Zell-Dupletten im SSC
4. Live-Dead-Signale gegen CD19-Signale: Auswahl lebendiger CD19⁺ Zellen.

Die lebenden einzelnen CD19⁺ Zellen wurden auf folgende Subpopulationen hin analysiert: CD27⁻ IgD⁺ naïve B-Zellen; CD27⁺ IgD⁻ *switched memory* B-Zellen; CD27⁺ IgD⁺ *non-switched memory* B-Zellen; CD27⁻ IgD⁻ *memory* B-Zellen; CD24⁺⁺ CD38⁺⁺ *transitionale* B-Zellen; CD24⁻ CD38⁺⁺ Plasmablasten; CD21_{low} CD38_{low} B-Zellen; CD23⁺ B-Zellen. Die Gating-Strategie für CD23⁺ B-Zellen basiert auf Publikationen von Bonnefoy [169] und Yap *et al.* [170], die für alle anderen untersuchten Subpopulationen basiert auf einer Publikation von Morbach *et al.* [171]. In Abbildung S 1 ist die Gating-Strategie exemplarisch anhand der repräsentativen Probe H02 dargestellt.

Die Prozentsätze der Subpopulationen in allen Proben wurden aus FlowJo als csv-Dateien exportiert und in Excel weiter analysiert. Der Tabelle wurde eine Spalte für die Zuordnung der Proben zu den sechs Gruppen (s. Kapitel 4.8) hinzugefügt. Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Prozentsätze aller Subpopulationen für die jeweiligen Kohorten erfolgte in R. Zudem wurden in R unter Verwendung des R-Pakets „car“ [172] mit einem linearen Modell (Kovarianzanalyse, ANCOVA) mit Quadrat-Summen vom Typ II die anteiligen Effekte von den Variablen Gruppe und Geschlecht (kategorial, ohne Interaktion) und Alter (metrisch) auf die prozentuale Verteilung einer jeden Subpopulation berechnet. Diese Herangehensweise ermöglicht die gemeinsame Analyse der mutmaßlich assoziierten Variablen auf die zu erklärende Variable.

Als Indikator für signifikante Unterschiede in der Frequenz der Subpopulationen wurden F-Test p-Werte $\leq 0,05$ für den Haupteffekt „Gruppe“ betrachtet. Dieser angesichts multipler Tests relativ liberale Cutoff-Wert für das Signifikanzniveau wurde gewählt, damit keine interessanten Assoziationen durch einen Fehler 2. Art übersehen werden. Paarweise Vergleiche zwischen den Studienkohorten wurden anschließend mit dem R-Paket „multcomp“ [173] mit Tukey post-hoc Tests durchgeführt. Die Visualisierung der Daten erfolgte in Beeswarm-Plots.

4.11 MICRORNA-EXPRESSIONSANALYSE IN B-ZELLEN VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN

MicroRNA-Profiling

Reife miRNAs und miRNA-Isoformen wurden in B-Zellen von MS-Patienten und gesunden Kontrollen unter Verwendung von *custom* RT Primer Pools und *customized* Specialty TaqMan® Array Karten für TaqMan® miRNA-Assays quantifiziert. Die *classic* TaqMan® miRNA-Assays, mit miRNA-spezifischen *stem-loop* Primern, sind hoch spezifisch und erlauben auch die Diskriminierung von Isoformen, die sich nur um ein Nukleotid unterscheiden [158, 174, 175]. Die 384-Well-Karten sind wie die für die Genotypisierung genutzten Karten aufgebaut (das heißt 1 Karte für 8 Proben); in den Wells sind Vorwärts- und Rückwärtsprimer und FAM™-markierte *probes* immobilisiert. Die Durchführung des miRNA-Profilings erfolgte gemäß der Herstelleranleitung für die Verwendung von Megaplex™ Primerpools für miRNA-Expressionsanalysen. Die Reverse Transkription erfolgte mit 35 ng RNA pro Probe. Die cDNA wurde in 12 PCR-Zyklen präamplifiziert und bei -20°C weggefroren. Die qPCR-Messungen wurden binnen 48 h mit dem TaqMan Universal Master Mix II, mit UNG, angesetzt und am ViiA 7 mit 45 Amplifikationszyklen gefahren. Die 29 in Tabelle 3 angegebenen miRNAs wurden in die Analyse einbezogen. Für vier miRNAs erfolgten die Messungen in Triplikaten, für alle anderen einzeln, sodass insgesamt 37 Messungen liefen. Die weiteren elf Felder auf der Karte beinhalteten Assays für andere Studien der Arbeitsgruppe.

Tabelle 3: Auswahl von miRNAs und IsomiRs für die Quantifizierung in B-Zellen

Bezeichnung Molekül ¹	Typ	Länge	Rep.	Sequenz
hsa-miR-191-5p	Referenz	23	3	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG
hsa-miR-26a-5p {hsa-miR-26a-2} 14_35	MS-asso.	22	1	UUCAAGUAUCCAGGAUAGGCU
hsa-miR-26a-5p {isomiR} 14_34	MS-asso.	21	1	UUCAAGUAUCCAGGAUAGGC
hsa-miR-26a-2-3p {hsa-miR-26a-2} 52_73	MS-asso.	22	1	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC
hsa-miR-199a-5p {hsa-miR-199a-1} 6_28	MS-asso.	23	1	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC
hsa-miR-199a-5p {isomiR} 6_27	MS-asso.	22	1	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUU
hsa-miR-199a-3p {hsa-miR-199a-1} 47_68	MS-asso.	22	3	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA
hsa-miR-199a-3p {isomiR} 47_67	MS-asso.	21	1	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUU
hsa-miR-548ac-5p {isomiR} 17_37	MS-asso.	21	1	AAAGUUUAUUGUGGUUUUUGCU
hsa-miR-548ac-3p {hsa-miR-548ac} 53_74	MS-asso.	22	1	CAAAAACCGGAAUUACUUUUG
hsa-miR-934-5p {hsa-miR-934} 15_36	MS-asso.	22	3	UGUCUACUACUGGAGACACUGG
hsa-miR-934-5p {isomiR} 15_34	MS-asso.	20	1	UGUCUACUACUGGAGACACU
hsa-miR-934-3p {isomiR} 51_72	MS-asso.	22	1	GAGUCUCCAGUAUAGGACGGGA
hsa-miR-3661-5p {hsa-miR-3661} 21_42	MS-asso.	22	1	UGACCUGGGACUCGGACAGCUG
hsa-miR-3661-5p {isomiR} 21_41	MS-asso.	21	1	UGACCUGGGACUCGGACAGCU
hsa-miR-3671-5p {isomiR} 4_20	MS-asso.	17	1	UUAUUGCUGCUGCUGUC
hsa-miR-3671-5p {isomiR} 4_20_C	MS-asso.	17	1	UUACUGCUGCUGCUGUC
hsa-miR-3671-3p {hsa-miR-3671} 60_81	MS-asso.	22	1	AUCAAAUAAGGACUAGUCUGCA
hsa-miR-4252-3p {hsa-miR-4252} 35_53	MS-asso.	19	1	GGCACUGAGUCAGCACCA
hsa-miR-4304-5p {hsa-miR-4304} 11_27	MS-asso.	17	1	CCGGCAUGUCCAGGGCA
hsa-miR-4304-3p {isomiR} 36_53	MS-asso.	18	1	GCUCUGACUGCUGCCA
hsa-miR-4423-5p {hsa-miR-4423} 13_34	MS-asso.	22	3	AGUUGCCUUUUUGUUUCCCAUGC
hsa-miR-4423-5p {isomiR} 13_33	MS-asso.	21	1	AGUUGCCUUUUUGUUUCCCAUG
hsa-miR-4423-3p {hsa-miR-4423} 49_69	MS-asso.	21	1	AUAGGCACCAAAAGCAACAA
hsa-miR-4423-3p {isomiR} 49_68	MS-asso.	20	1	AUAGGCACCAAAAGCAACA
hsa-miR-4464-5p {hsa-miR-4464} 12_32	MS-asso.	21	1	AAGGUUUGGAUAGAUGCAAUA
hsa-miR-4464-5p {isomiR} 16_36	MS-asso.	21	1	UUUGGAUAGAUGCAAUAAAUG
hsa-miR-4464-3p {isomiR} 62_80	MS-asso.	19	1	UUAUUGCAUCUAUCCAAAC
hsa-miR-4492-3p {isomiR} 59_75	MS-asso.	17	1	GGGCUGGGCGCGCGCCA

TaqMan-Assays für 28 miRNAs und IsomiRs von 11 verschiedenen humanen MS-assoziierten miRNA-Genen (MS-asso.) und hsa-miR-191-5p als Referenz-miRNA (Referenz) zur Normalisierung wurden vom Hersteller Thermo Fisher zur Quantifizierung auf *customized* TaqMan-Array-Karten aufgebracht. Die Referenz-miRNA und die miRBase-annotierten reifen Formen von hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-934-5p und hsa-miR-4423-5p wurden in technischen Triplikaten gemessen. ¹ IsomiR-Namen wurden so definiert, wie von Cloonan *et al.* [98] vorgeschlagen; MS = Multiple Sklerose; Rep. = Anzahl der technischen Triplikate.

Die miRNAs wurden wie folgt ausgewählt: Für die elf identifizierten MS-assoziierten miRNA-kodierenden Sequenzen (s. Kapitel 4.3 und 5.1) wurden alle miRBase-annotierten -3p und -5p reifen miRNAs [81] in eine Excel-Datei exportiert. Ein besonderes Anliegen war es, auch potentielle IsomiR-Varianten dieser miRNAs, die nicht in miRBase gelistet sind (Kapitel 4.2), zu messen. Deshalb wurden aus der Datenbank IsomiR Bank [147] Informationen zu möglichen IsomiRs extrahiert und der

Excel-Datei hinzugefügt. IsomiR-Sequenzen mit *mismatches* wurden berücksichtigt, wenn sie aus SNPs mit MAFs > 1 % (dbSNP 151) resultierten. IsomiRs wurden entsprechend ihrer kumulativen rpm priorisiert. Außerdem wurden normalisierte Expressionsdaten für die miRNAs aus der Datenbank miRCarta [150] extrahiert. Folgen von Basen mit *read counts* $\geq 0,5$ des höchsten *read counts* für den Sequenzbereich der miRBase-annotierten reifen miRNA, wurden als weitere mögliche IsomiRs in Betracht gezogen und der Excel-Datei hinzugefügt. Aus der Datei wurden zunächst alle miRBase-annotierten miRNAs ausgewählt ($n = 14$). Wenn möglich, erfolgte für jeden Strang (-3p und -5p) die Auswahl mindestens einer reifen IsomiR mit einer Länge von > 16 Basen. Pro Strang wurden bis zu zwei IsomiRs ausgewählt. Für die allelischen Varianten von rs521188 in hsa-miR-3671-5p wurden zwei Assays entworfen. Das Assay-Design mit dem Custom TaqMan Small RNA Assay Design Tool auf der Website von Thermo Fisher Scientific schlug für die miRBase-gelistete hsa-miR-4492-3p (Sequenz: GGGGCTGGGGCGCGCGGCC) fehl. Für die anderen 13 miRNAs war das Design erfolgreich. Insgesamt wurden 15 IsomiRs berücksichtigt. Als Referenz-miRNA wurde hsa-miR-191-5p genutzt [156, 157].

Datenauswertung

Die Auswertung der miRNA-Expressions-Profile erfolgte mit der ExpressionSuite Software. Analog wie in Kapitel 4.7 beschrieben, wurden die Qualitätsparameter und die C_T -Werte automatisiert von der Software bestimmt. Assays, für die die automatisierte *Threshold*-Berechnung fehlschlug (Qualitätsparameter: *THD flag*), wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Es folgte der Export der Ergebnisse als csv-Datei. Konnte innerhalb von 45 PCR-Zyklen kein C_T -Wert bestimmt werden, wurde dieser fehlende Wert mittels eines Algorithmus aus dem R-Paket „*nondetects*“ imputiert [176]. Die Imputation der Werte erfolgte mit der Option „*single imputation of missing values*“ und ansonsten Standardparametern. Die nach der Imputierung vollständige Datenmatrix von C_T -Werten wurde in Excel importiert und der Tabelle wurde eine Spalte zur Zuordnung der Proben zu den sechs Studienkohorten hinzugefügt. ΔC_T -Werte wurden berechnet. Für die verschiedenen miRNA-Assays wurden die mittleren ΔC_T -Werte und die entsprechenden Standardabweichungen für die sechs Studienkohorten berechnet. Für die anschließende Kovarianzanalyse erfolgte zunächst die Konversion der ΔC_T -Werte in eine lineare Skala ($2^{-\Delta C_T} \times 1.000$). In R wurden mit dem R-Paket „*car*“ [172] (wie bereits in Kapitel 4.10 beschrieben) die anteiligen Effekte von Gruppe, Geschlecht und Alter auf die Varianz in den Daten für jede miRNA berechnet. Mit paarweisen Tukey post-hoc Tests (R-Paket „*multcomp*“ [173]) wurde anhand der ΔC_T -Werte berechnet, welche Gruppen sich voneinander in der Expression der miRNAs unterscheiden. P-Werte $\leq 0,05$ zeigten signifikante Unterschiede in der miRNA-Expression zwischen den Gruppen an. Die Daten wurden in Beeswarm-Plots visualisiert.

4.12 TRANSKRIPTOMANALYSE VON B-ZELLEN VON MS-PATIENTEN

Die Transkriptomanalyse von B-Zellen von MS-Patienten und gesunden Kontrollen wurde von der Core Facility für Micro-Array-Technologie vorbereitet und durchgeführt. Die RNA-Integrität der Proben wurde mit dem RNA 6000 pico Kit und dem 2100 Bioanalyzer überprüft. Für die Transkriptomanalysen mit Clariom D-Arrays (s. auch Kapitel 4.7) wurden jeweils 100 ng RNA pro B-Zell-Probe verwendet.

Datenauswertung

Die Datennormalisierung und Qualitätskontrolle erfolgte analog wie in Kapitel 4.7 beschrieben in TAC. Die Expressionswerte von an der miRNA-Biogenese beteiligten Genen (AGO2, DROSHA, DGCR8, DICER1, TARBP2 und XPO5 [100]), der miRNA *host* Gene und der priorisierten Zieltranskripte der MS-assozierten miRNAs wurden als txt-Dateien exportiert und in Excel-Tabellen konvertiert. Der Tabelle wurde eine Spalte zur Zuordnung der Proben zu den sechs Studienkohorten hinzugefügt. In R wurden wieder mit dem R-Paket „car“ [172] mit einer Kovarianzanalyse (wie bereits in Kapitel 4.10 beschrieben) die anteiligen Effekte von Gruppe, Geschlecht und Alter auf die Varianz in den Daten für die jeweiligen Expressionswerte berechnet. F-Test p-Werte $\leq 0,05$ zeigten signifikante Unterschiede in der Expression zwischen den Gruppen an.

4.13 INTEGRATIVE ANALYSE DER SNP-GENOTYPEN, MICRORNA-LEVEL UND TRANSKRIPTOMDATEN

Die Softwareumgebung R wurde genutzt, um Assoziationen zwischen 1) den Genotypen der MIR SNPs und MS *lead* SNPs, 2) der Expression der miRNAs und IsomiRs und 3) der Expression der *host* Gene zu analysieren. Die ΔC_T -Werte wurden hier zunächst in eine lineare Skala konvertiert ($2^{-\Delta C_T} \times 1.000$). Unter Verwendung der R-Pakete „car“ [172] und „lme4“ [177] wurden jeweils mit einem gemischten linearen Modell basierend auf Wald χ^2 -Tests mit Typ II Quadrat-Summen die anteiligen Effekte der festen Variablen Genotyp, Alter und Geschlecht (ohne Interaktionsterm) und der zufälligen Variable Gruppe auf die zu erklärende Variable (= Expressionslevel der miRNA bzw. des *host* Gens) untersucht. Der Genotyp, das Alter und das Geschlecht jedes Probanden ist klar definiert, während die Einteilung der Probanden in die Gruppen vom Studiendesign abhängt und daher eine Auswahl von möglichen DMTs und MS-Verlaufsformen darstellt. Der Gruppeneffekt wurde daher als Zufallseffekt behandelt. So kann unter anderem die Therapie Effekte auf die Expressionslevel haben. Die gemischten linearen Modelle wurden für die eQTL-Analysen genutzt, um Verfälschungen durch solche Effekte herauszurechnen. P-Werte $\leq 0,05$ zeigten signifikante Assoziationen zwischen Genotyp und miRNA- bzw. *host* Gen-Expression an.

Weiterhin wurden Effekte der Expressionslevel der miRNAs auf die Transkriptlevel ihrer priorisierten

Zielgene untersucht. Dazu wurden ebenfalls gemischte lineare Modelle an die Daten gefittet, wobei die miRNA-Level (in lineare Skala konvertierte ΔC_T -Werte) die Transkriptlevel der Zielgene erklären und für Alter, Geschlecht und Gruppe adjustiert wurde. Sowohl p-Werte als auch β -Koeffizienten wurden berechnet. P-Werte $\leq 0,05$ zeigten signifikante Assoziationen an. Negative β -Koeffizienten deuteten auf einen negativen Effekt der miRNA-Expressionslevel auf die Expression der Zielgene in B-Zellen hin.

5. ERGEBNISSE

5.1 GENETISCH MIT MS-ASSOZIIERTE MICRORNAs

Die Datenbanken-basierte Selektion von MS-assoziierten miRNAs ergab 127 miRNA-kodierende Sequenzen (von 1.881 miRBase-gelisteten Vorläufer-miRNAs), die in der Nähe (< 250 kb) von 107 der 233 in der jüngsten GWAS beschriebenen MS-assoziierten genetischen Varianten [36] kodiert werden. 65 dieser Vorläufer-miRNAs liegen in Genregionen, die laut Ldproxy tendentiell zusammen mit MS-assoziierten *lead* SNPs vererbt werden ($r^2 < 0,1$). Außerdem wird ein mutmaßliches Mirtron, hsa-mir-6891, 200 bp entfernt von der MS-assoziierten Variante HLA-B*38:01, die jedoch nicht in dbSNP 150 enthalten ist, kodiert. In den miRNA-kodierenden *stem-loop* Sequenzen und ± 50 umliegenden bp sind für 23 miRNA-Vorläufer insgesamt 25 SNPs mit MAFs $\geq 1\%$ annotiert. Davon sind 17 SNPs in oder nahe von 15 miRNA-kodierenden Sequenzen in LD ($D' \geq 0,7$) mit MS *lead* SNPs. Bei zwei dieser miRNAs handelt es sich mutmaßlich um nicht-kanonisch prozessierte miRNAs, bei denen die SNPs einen Einfluss auf das Splicing haben könnten. Die SNPs in zwei weiteren miRNAs betreffen mutmaßlich das Dicing. Für die vorliegende Studie wurden daher elf miRNAs und 13 zugehörige MIR SNPs priorisiert (Tabelle 4).

In Tabelle S 14 sind alle weiteren miRNAs, die laut den LD-Angaben in Ldproxy tendentiell zusammen mit MS-assoziierten *lead* SNPs vererbt werden, angegeben. Unter den elf für diese Studie ausgewählten miRNAs ist eine, hsa-mir-934, welche auf dem X-Chromosom liegt. Sechs der elf miRNAs werden in den intronischen Sequenzen von anderen *host* Genen kodiert. Für die anderen fünf miRNAs ist kein entsprechendes *host* Gen in den Datenbanken (Ensembl, UCSC) annotiert. Für hsa-mir-4304 und hsa-mir-4464 ergaben sich jeweils zwei MIR SNPs. In zehn Fällen wird für das LD-Maß D' der Höchstwert oder nahezu der Höchstwert von 1,0 erreicht. Niedrige Werte für r^2 für fast alle SNP-Paare sind unter anderem durch unterschiedliche Allelfrequenzen der MS *lead* SNPs und MIR SNPs bedingt (s. auch Tabelle 9, S. 56). Für sieben der MIR SNPs ergaben sich MAFs von unter 5 % (laut dbSNP 151). Ein MIR SNP, rs521188 in hsa-mir-3671, liegt im basalen *stem* des pri-miR-Moleküls. Das seltenerne MS-Risikoallel des Polymorphismus führt hier zu einer Watson-Crick-Basenpaarung statt einer Wobble-Paarung. Die SNPs in hsa-mir-548ac und hsa-mir-934 sind ebenfalls im basalen *stem* lokalisiert. Das rs1414273G-Allel führt in der pri-mir-548ac-Struktur zu einer Wobble-Basenpaarung, während das A-Allel zu einer Watson-Crick-Paarung an dieser Stelle führt. Das seltenerne Allel von rs73558572 führt im basalen *stem* von hsa-mir-934 zur Bildung eines *mismatches*, wo ansonsten eine Basenpaarung vorliegt. Alle weiteren identifizierten SNPs liegen in den flankierenden Segmenten der miRNAs. Drei davon liegen in CNNC-Motiven: rs817478, rs1005039 und rs41292017.

Tabelle 4: Priorisierte microRNAs aus MS-assozierten genetischen Regionen

microRNA	miRBase ID [81]	Chr.	Strang	Genlocus	MS <i>lead</i> SNP	Distanz zu microRNA	MIR SNP	LD-Maße (EUR)		MIR SNP Allelfreq.	Pos.
								R^2	D'		
hsa-mir-26a-2	MI0000750	chr12	-	CTDSP2 (Intron)	rs701006	111556 bp	rs41292017	0,0052	1,0000	G: 98,159%; A: 1,841 %	3'(+21)
hsa-mir-199a-1	MI0000242	chr19	-		rs12609500	245756 bp	rs1005039	0,0027	1,0000	C: 98,601%; T: 1,399 %	3'(+24)
hsa-mir-548ac	MI0016762	chr1	-	CD58 (Intron)	rs10801908	12153 bp	rs1414273	0,9672	0,9916	C: 57,186%; T: 42,814 %	3'(+11)
hsa-mir-934	MI0005756	chrX	+	VGLL1 (Intron)	rs2807267	33334 bp	rs73558572	0,0108 ²	0,9674 ²	G: 98,959%; A: 1,041 %	5'(-6)
hsa-mir-3661	MI0005756	chr5	+		rs244656	111621 bp	rs779704489	NA	NA	A: 98,142%; C: 1,858 %	3'(+34)
hsa-mir-3671	MI0016072	chr1	-	JAK1 (Intron)	rs72922276	94119 bp	rs521188	0,0032	1,0000	A: 89,286%; G: 10,714 %	5'(-6)
hsa-mir-4252	MI0015864	chr1	-		rs2986736	22591 bp	rs2003071	0,1498	0,7869	C: 91,072%; T: 8,928 %	3'(+38)
hsa-mir-4304	MI0015832	chr12	-	PITPNM2 (Intron)	rs7975763	108778 bp	rs78351440	0,0135	1,0000	C: 93,986%; A: 6,014 %	5'(-24)
hsa-mir-4423	MI0016760	chr1	+		rs35486093	130264 bp	rs817478	0,0115	0,7445	G: 89,307%; C: 10,693 %	5'(-15)
hsa-mir-4464	MI0016812	chr6	+	AL132996.1 (Intron)	rs72928038	45693 bp	rs77896647	0,0008 ²	1,0000 ²	A: 73,207%; C: 26,793 %	3'(+18)
hsa-mir-4492	MI0016854	chr11	+		rs12365699	38131 bp	rs7926599	0,0030	1,0000	G: 98,942%; A: 1,058 %	3'(+22)
					rs6589706	33604 bp	rs80063010	0,0125	1,0000	G: 98,822%; T: 1,058 %	5'(-56)
										G: 98,511%; C: 1,489 %	3'(+40)

In der Nähe von zwölf bekannten MS-assozierten *lead* SNPs wurden elf miRNA-kodierende Sequenzen identifiziert, in oder nahe denen 13 SNPs (MIR SNPs) liegen, die mit den MS *lead* SNPs im Kopplungsungleichgewicht (LD) sind. Die MIR SNPs beeinflussen mutmaßlich die Prozessierung der pri-miRNAs durch Microprocessor. Für die miRNAs ist angegeben, auf welchem DNA-Strang sie kodiert werden. Die Allele der MIR SNPs sind für den Plus-Strang der DNA angegeben. Für zwei SNP-Paare war die Berechnung der LD-Maße nicht möglich: rs80063010 und rs77970448. Allelfreq. = Allelfrequenz; Chr.: Chromosom; Distanz zu microRNA: Distanz zwischen MS *lead* SNP und miRNA *stem-loop*; MS = Multiple Sklerose; Pos.: Position der MIR SNPs relativ zu den pre-miRNA-kodierenden Sequenzen; r^2 und D': Maße für das LD zwischen den MS *lead* SNPs und MIR SNPs (Population: EUR; ²Population: ALL); SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus.

5.2 GENOTYP-ABHÄNGIGE PROZESSIERUNG VON MICRORRNAs

Die MS-assozierten miRNAs wurden daraufhin untersucht, ob die Genotypen der MIR SNPs die enzymatische Prozessierung durch Microprocessor beeinflussen. Vorab wurde die erfolgreiche Einbringung von Mutationen in die verschiedenen Vorläufer-Plasmide, die für diese Untersuchung genutzt wurden, per Sequenzierung nachgewiesen. Der Erfolg der jeweiligen Klonierungen der verschiedenen miRNA-Vorläufersequenzen in die Luciferase-Vektoren wurde mittels Kontrollrestriktion bestätigt.

Vorversuche

Die Eignung von Luciferase-Assays für die Analyse und die optimalen Bedingungen hierfür wurden bestimmt. Die normalisierten Lumineszenzsignale, die nach Durchführung der Assays nach

Transfektion von HeLa-Zellen mit dem Kontrollplasmid (Negativkontrolle ohne Vorläufer-miRNA-Sequenz) und zwei Luciferase-mir-16-1-Plasmiden (Positivkontrolle) berechnet wurden, sind in Abbildung 7 dargestellt. Die GLuc/SEAP-Verhältnisse für das Kontrollplasmid lagen über alle Konzentrationen und Zeitpunkte zwischen 0,5 und 1,6 und sanken von 24 h zu 72 h. Bei der Transfektion mit 100 ng und dem Assay nach 24 h war der GLuc/SEAP-Quotient mit etwa 0,5 einer der niedrigsten. Niedrige GLuc/SEAP-Verhältnisse für diese Messanordnungen wurden auch für die hsa-mir-16-1-Plasmide beobachtet. Über alle DNA-Konzentrationen und Zeitpunkte hinweg wurde für das hsa-mir-16-1-T-Plasmid (Mutante) im Vergleich zum hsa-mir-16-1-C-Plasmid (Wildtyp) ein signifikant erhöhtes GLuc/SEAP-Verhältnis beobachtet, was eine deutlich verminderte Prozessierungseffizienz durch Microprocessor anzeigen. Damit konnte die Tauglichkeit des Assays für die Analyse auf eine Genotyp-abhängige pri-miRNA-Prozessierung bestätigt werden. Für die anschließende Analyse der elf MS-assoziierten miRNAs (13 MIR SNPs) wurden Transfektion mit 200 ng und 300 ng und Messungen nach 24 h und 48 h durchgeführt, da sich hierfür im Vorversuch die stabilsten Befunde zeigten.

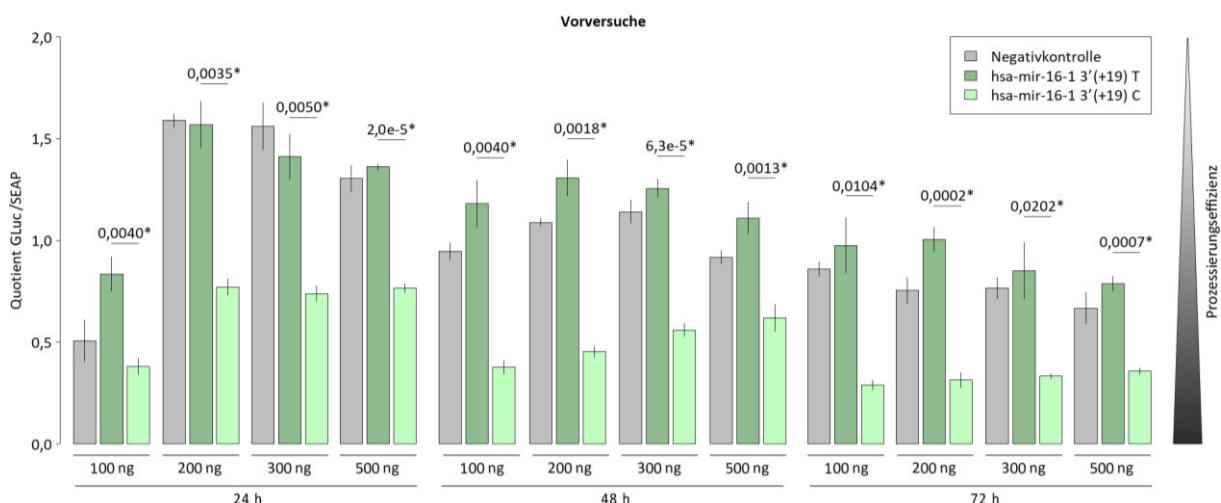


Abbildung 7: Normalisierte Lumineszenzsignale aus den Vorversuchen für die Prozessierungsanalyse. Angegeben sind als Balken die mittleren GLuc/SEAP-Quotienten ($n = 3$ biologische Replikate) und als Fehlerbalken die Standardabweichungen für Luciferase-Assays zu drei Zeitpunkten nach der Transfektion von HeLa-Zellen mit drei verschiedenen Plasmiden mit vier verschiedenen DNA-Mengen. Das C an Position 3'(+19) in hsa-mir-16-1 geht gegenüber der T-Mutation mit signifikant verringerten Lumineszenz-Signalen einher. Geringe Lumineszenz-Signale sind durch eine höhere Spaltrate der pri-miRNA in die pre-miRNA bedingt. Für das Plasmid mit dem 3'(+19) T und das Kontrollplasmid wurden ähnliche GLuc/SEAP-Quotienten gemessen. Insgesamt war eine Tendenz zu geringeren GLuc/SEAP-Quotienten, je später die Luciferase-Assays nach Transfektion durchgeführt wurden (nach 24 h, 48 h oder 72 h), zu sehen. Für die Transfektion mit 100 ng DNA und dem Assay nach 24 h waren deutlich geringere Quotienten gegenüber den anderen DNA-Mengen zu diesem Zeitpunkt zu beobachten. Welch t-Test p-Werte für den Vergleich der GLuc/SEAP-Quotienten der beiden Luciferase-mir-16-1-Plasmide sind angegeben und signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) hervorgehoben (*). GLuc = Gaussia Luciferase; h = Stunde; SEAP = Sekretierte alkalische Phosphatase.

Analyse von MS-assoziierten microRNAs

Für sechs SNPs in sechs miRNA-kodierenden Sequenzen konnte mittels Luciferase-Assays ein Einfluss des Genotyps auf die Effizienz der Spaltung durch Microprocessor gezeigt werden, wie in Abbildung 8 dargestellt ist. Für diese sechs miRNAs wurde für mindestens einen der vier Vergleiche ein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Allelausprägungen (Welch t-Test p-Wert < 0,05) beobachtet. Die MS-Risikoallele von rs73558572G in hsa-mir-934, rs77905262C in hsa-mir-4304 und

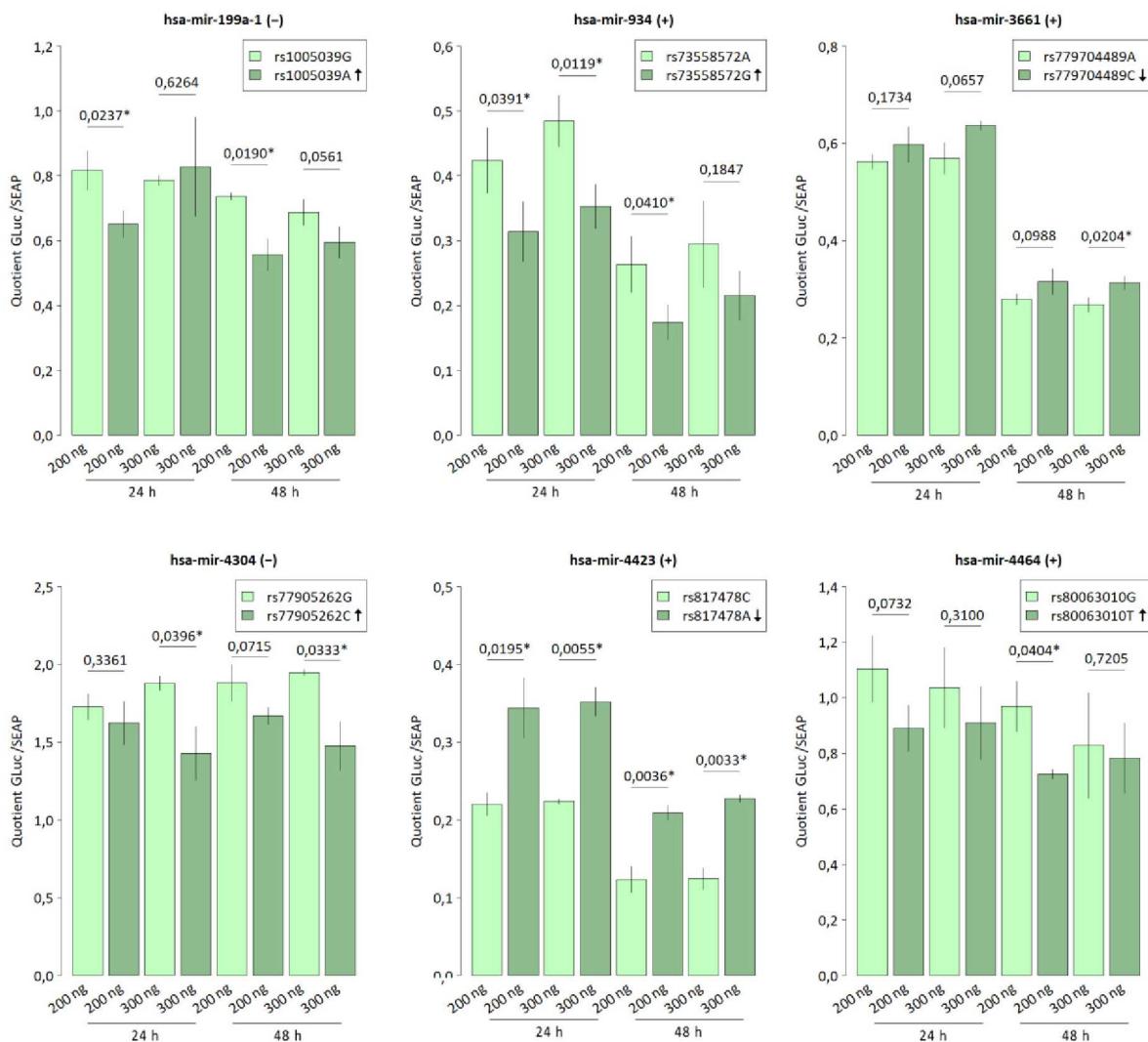


Abbildung 8: Allelspezifische Prozessierung von miRNA-Vorläufersequenzen im Reporter-Assay. Für sechs miRNAs, hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934, hsa-mir-3661, hsa-mir-4304, hsa-mir-4423 sowie hsa-mir-4464 zeigte sich eine vom Genotyp abhängige Prozessierung der pri-miRNAs in HeLa-Zellen in Luciferase-Assays. Die mittleren GLuc/SEAP-Quotienten und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten sind angegeben. Signifikante Unterschiede im Welch t-Test ($p < 0,05$) sind hervorgehoben (*). Die MS-Risikoallele stehen jeweils an zweiter Stelle (dunkelgrün). Pfeile indizieren, ob für das MS-Risikoallel eine bessere (\uparrow) oder schlechtere (\downarrow) Prozessierungseffizienz gemessen wurde. Die Allele sind jeweils in Bezug auf den DNA-Strang, auf dem die verschiedenen miRNA-kodierenden Sequenzen liegen (in Klammern angegeben), aufgeführt. GLuc = Gaussia Luciferase; h = Stunde; SEAP = Sekretierte alkalische Phosphatase.

rs80063010T in hsa-mir-4464 sowie das protektive Allel von rs817478C in hsa-mir-4423 gingen für alle vier Vergleiche konsistent mit verringerten GLuc/SEAP-Quotienten verglichen mit dem jeweils anderen Allel einher. Für rs1005039A in hsa-mir-199a-1 ergab sich dieser Trend für drei der Vergleiche. Für rs779704489 in hsa-mir-3661 konnte für die MS-Risikoallelvariante verglichen mit dem anderen Allel konsistent ein geringfügig höherer GLuc/SEAP-Quotient gezeigt werden.

Die stärkste Evidenz konnte für hsa-mir-4423 erbracht werden: Bei allen vier Vergleichen führte der C-Genotyp im CNNC-Motif des MIR SNPs zu einer erhöhten miRNA-Prozessierung, wie durch signifikant verminderte GLuc/SEAP-Verhältnisse verglichen mit dem A-Genotyp gezeigt werden konnte. Außerdem resultierten für hsa-mir-4423 die niedrigsten GLuc/SEAP-Quotienten (< 0,35), was auf eine besonders gute Prozessierung der pri-miRNA hinweist. Die Prozessierung von hsa-mir-934 war für den G-Genotyp im Vergleich zum A-Genotyp bei drei der vier Vergleiche signifikant effizienter. Bei hsa-mir-199a-1 korrelierte der A-Genotyp im CNNC-Motif mit einem verringerten GLuc/SEAP-Verhältnis und somit einer erhöhten miRNA-Prozessierung im Vergleich zum häufigeren G-Genotyp. Ein Trend zu einer höheren miRNA-Prozessierung wurde auch für hsa-mir-4304 mit dem Genotyp rs77905262C im Vergleich zu rs77905262G gefunden. Zwei von vier Vergleichen wiesen hierbei signifikante Unterschiede auf. Für hsa-mir-3661 (rs779704489) und hsa-mir-4464 (rs80063010) ergab nur ein Vergleich einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen.

Keine konsistenten Einflüsse des Genotyps auf die enzymatische Verarbeitung der pri-miRNAs konnten für hsa-mir-26a-2 (rs41292017), hsa-mir-548ac (rs1414273), hsa-mir-3671 (rs521188), hsa-mir-4252 (rs2003071), hsa-mir-4304 (rs78351440), hsa-mir-4464 (rs77896647) und hsa-mir-4492 (rs7926599) festgestellt werden (nicht dargestellt).

5.3 MICRORNA-ZIELGENE

Für drei pri-miRNAs, hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934 und hsa-mir-4423, wurde eine Analyse auf Zielgene in HeLa-Zellen durchgeführt. Aus den mit Vorläufer-Plasmiden bzw. *scrambled*-Kontrollplasmid transfizierten Zellen wurde RNA mit Konzentrationen zwischen 170 ng/µl bis 410 ng/µl extrahiert. Die RINs für die Proben lagen zwischen 7,0 und 9,9. Die spezifische Überexpression der miRNAs in den Zellen nach Transfektion mit den entsprechenden Vorläufer-Plasmiden konnte per *stem-loop* qPCR-Analyse bestätigt werden. Die Mittelwerte gültiger ΔC_T -Werte für die reifen miRNAs in HeLa-Zellen, die mit den Vorläufer-Plasmiden bzw. dem Kontrollplasmid transfiziert wurden, sind in Tabelle 5 angegeben. Die endogene Expression der reifen hsa-miR-199a-3p und -5p, hsa-miR-934-5p und hsa-miR-4423-3p und -5p in HeLa-Zellen war für alle miRNAs gering bis nicht messbar (das heißt hohe ΔC_T -Werte). Die Überexpression führte zu einer deutlichen Erhöhung der detektierbaren miRNA-Level.

Eine ΔC_T -Differenz von > 10 im Vergleich von mit Vorläufer-Plasmiden transfizierten Zellen zur Kontrolle entspricht einer > 1000 -fach erhöhten Expression.

Tabelle 5: Expression von reifen miRNA-Molekülen in HeLa-Zellen nach Transfektion

Transfektion	Zeitpunkt	hsa-miR-199a-5p MW \pm SD	hsa-miR-199a-3p MW \pm SD	hsa-miR-934-5p MW \pm SD	hsa-miR-4423-5p MW \pm SD	hsa-miR-4423-3p MW \pm SD
scr Kontrolle	24 h	11,616 (1) NA	10,264 \pm 0,637	14,576 \pm 0,696	NA	14,306 (1) NA
scr Kontrolle	48 h	11,243 (3) NA	9,964 \pm 0,329	15,229 (2) \pm 0,621	12,247 (3) NA	13,519 (1) \pm 2,565
pri-mir-199a-1	24 h	2,325 \pm 0,073	-2,530 \pm 0,095	NA	NA	NA
pri-mir-199a-1	48 h	1,697 \pm 0,328	-3,431 \pm 0,582	NA	NA	NA
pri-mir-934	24 h	NA	NA	-3,812 \pm 0,074	NA	NA
pri-mir-934	48 h	NA	NA	-3,737 \pm 0,828	NA	NA
pri-mir-4423	24 h	NA	NA	NA	-3,463 \pm 0,214	-4,126 \pm 0,179
pri-mir-4423	48 h	NA	NA	NA	-4,196 \pm 1,083	-4,814 \pm 0,807

Mittelwerte und Standardabweichungen (MW \pm SD) der ΔC_T -Werte als Maß der Expression der reifen miRNA-Moleküle relativ zu hsa-miR-191-5p für alle RNA-Proben aus HeLa-Zellen, die mit Vorläufer-Plasmiden transfiziert und nach 24 h (n = 2) oder 48 h (n = 4) lysiert wurden, sind angegeben. Konnten die reifen miRNAs nicht in allen Proben innerhalb von 45 PCR-Zyklen detektiert werden, ist in Klammern angegeben, in wie vielen Proben das Molekül nicht nachgewiesen werden konnte. Hohe ΔC_T -Werte bedeuten niedrige miRNA-Level. Für hsa-mir-934 ist für den 3p-Arm keine reife miRNA in der miRBase-Datenbank annotiert. h = Stunde; NA = Nicht bestimmt; scr = Scrambled.

Die Qualität der Transkriptomdaten aus der Analyse mit 24 Clariom D-Arrays wurde in der Software TAC beurteilt. Die automatische Qualitätskontrolle der Signalintensitäten für die Hybridisierungskontrollen in der Software zeigte keine Ausreißer. Die Trennung der Positivkontrollen von den Negativkontrollen anhand der Signalintensitäten konnte für jeden Array bestätigt werden. Die Mediane der log2 Signalintensitäten der einzelnen Arrays lagen in einem engen Bereich von 5,25 bis 5,73, was auf eine gute Vergleichbarkeit der Daten zwischen den Proben hindeutet. In der PCA konnten keine Probenausreißer nachgewiesen werden (Abbildung 9). Für die Microarrays mit den RNA-Proben, die 24 h nach der Transfektion extrahiert wurden (n = 8), und solchen, die nach 48 h extrahiert wurden (n = 16), ergaben sich zwei nah beieinander liegende Probencluster.

Mittels Transkriptomprofiling wurden solche Transkripte als potentielle Ziele der drei pri-miRNAs hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934 und hsa-mir-4423 ermittelt, die nach Überexpression der miRNAs zu beiden Zeitpunkten mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ und zu mindestens einem Zeitpunkt mit einem fc von $\leq -1,5$ niedriger exprimiert waren. Für hsa-mir-199a-1 ergaben sich 152 potentielle Zielgene, von denen 73 laut HGNC für Proteine kodieren (Abbildung 10). Für 60 dieser Transkripte wurde *in silico* die Hybridisierung ihrer 3' UTRs mit den reifen miRNA seed-Sequenzen bestätigt. Für hsa-mir-934 ergaben sich 94 potentielle Zielgene, von denen zehn priorisiert wurden. Für hsa-mir-4423 wurden 62 potentielle Zielgene, darunter jedoch nur ein Protein-kodierendes Gen, für welches *in silico* eine

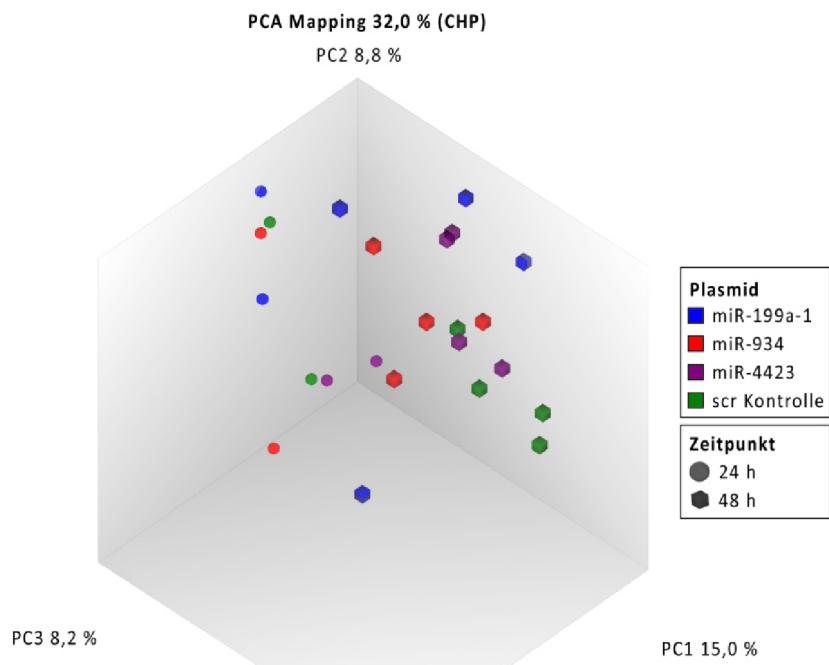


Abbildung 9: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten zur Zielgenanalyse. Durch drei Hauptkomponenten (*principal component*; PC) konnten 32 % der Variabilität in den Daten beschrieben werden. Für die beiden Zeitpunkte der RNA-Extraktion ergaben sich im Plot zwei Probencluster. Die HeLa-Zellen nach Transfektion mit den Vorläufer-Plasmiden zeigten in dieser Visualisierung keinen offenkundigen Unterschied im RNA-Profil zu den Zellen mit dem *scrambled*-Kontrollplasmid ($n = 6$ Arrays pro Plasmid). Insgesamt lagen die Microarrayprofile eng beieinander; Ausreißer waren nicht zu erkennen. Der PCA-Plot für die Arrays wurde in der Software TAC erstellt. h = Stunde; scr = *Scrambled*.

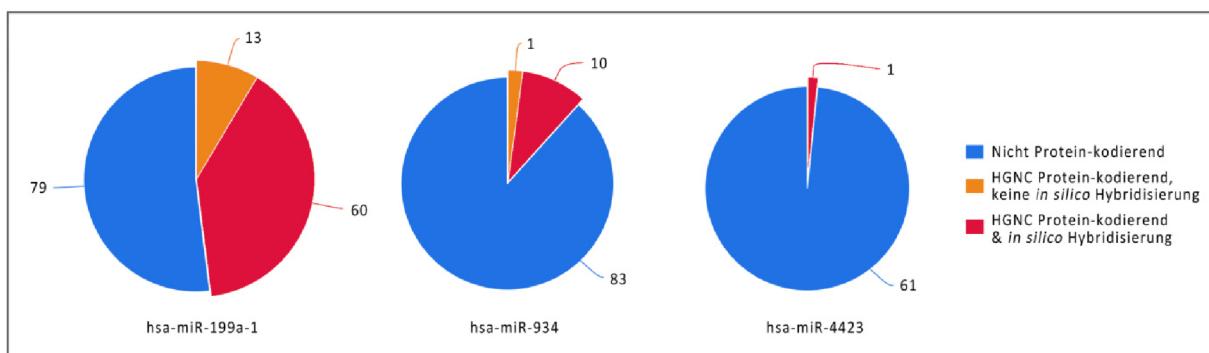


Abbildung 10: Die Anteile Protein-kodierender und nicht-kodierender potentieller Zielgene von hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934 und hsa-mir-4423. In Tortendiagrammen ist für die drei miRNAs gezeigt, wie sich ihre potentiellen Zielgene, die mittels Transkriptomprofiling identifiziert wurden, verteilen. Jeweils ein Großteil der Zielgene ist laut HGNC nicht Protein-kodierend (blau). Für einen Großteil aller laut HGNC Protein-kodierenden Gene wurde mit dem RNAhybrid-Webserver eine Hybridisierung der reifen miRNA-Sequenzen und den 3' UTR-Sequenzen *in silico* nachgewiesen. Rot stellt den Anteil dieser priorisierten Zielgene dar.

Hybridisierung gezeigt wurde, identifiziert. Während somit die Überexpression von hsa-mir-199a-1 auf Transkriptomebene einen relativ großen Effekt zeigte, hatte die Überexpression von hsa-mir-4423 hingegen nur eine geringe Wirkung. Für alle priorisierten Zielgene der drei miRNAs sind die *fcs* und *p*-Werte, die in TAC berechnet wurden, und die *mfes*, die mit RNAhybrid berechnet wurden, in den Tabellen S 15 – S 17 in Anhang 12.4 vollständig angegeben. Die priorisierten Zielgene der drei miRNAs sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Priorisierung von 26 der Zielgene von hsa-mir-199a-1 deckt sich zudem mit Vorhersagen durch miRWalk 3.0. In der Datenbank miRTarBase [118] sind außerdem NACC1 und TMOD2 bereits als Ziele von hsa-mir-199a-1 hinterlegt. Weiterhin sind laut miRWalk [119] Interaktionen der 3'UTRs von SLC16A1 und ZZZ3 mit hsa-miR-934-5p und des 3'UTRs von TMEM47 mit hsa-miR-4423-5p und -3p vorhergesagt.

Tabelle 6: Priorisierte Zielgene von hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934 und hsa-mir-4423

miRNA	n	Priorisierte Zielgene
hsa-mir-199a-1	60	ACTN4, AM22, ARHGAP31, ARPC1A, BMP1, CARD19, CD9, CDK4, CIZ1, CSNK1G2, CSRNP1, DYRK1B, EEF2, EFNA1, EPST1, FAIM, FEN1, FXR2, HEATR3, HTRA2, IER3, IRAK2, MAP3K12, MIF, MLX, MRPS36, MTG2, NACC1, NDUFA11, NT5C, OGFD3, OR8B3, PACS1, PEA15, PFKP, PNPLA6, PON2, PPIB, PRMT1, PROCR, RAB8A, RAD9A, RAP2B, RPS29, SIRT6, SPATA2, TAC1, TCEAL3, TMOD2, TNFRSF12A, TPRA1, TRAF1, TUBB6, UBE2D1, VIM, ZDHHC3, ZFYVE27, ZNF511, ZNF526, ZNF579
hsa-mir-934	10	C1orf162, CHORDC1, EGR1, ETF1, GADD45B, GTF2H1, KLHL15, SFPQ, SLC16A1, ZZZ3
hsa-mir-4423	1	TMEM47

Die potentiellen Zielgene, die laut HGNC Protein-kodierend sind und für die *in silico* eine Hybridisierung ihrer 3' UTR Sequenzen mit den reifen miRNA-Sequenzen gezeigt wurde, sind aufgelistet. Keines der Gene wurde als gemeinsames Zielgen von mehreren dieser miRNAs identifiziert.

Die Online-Tools Enrichr [164] und Reactome [162] wurden genutzt, um die Anreicherung der 60 Zielgene von hsa-mir-199a-1 in biologischen Prozessen aus verschiedenen Datenbanken zu analysieren. Die top fünf Signalwege laut Reactome und zwei Genkategorien laut Enrichr, denen die meisten Zielgene zugeordnet werden konnten, sind in Tabelle 7 angegeben. Für die KEGG- und WikiPathways-Datenbanken wurden jeweils maximal drei der 60 Gene als gemeinsam in einem Signalweg beteiligt gefunden; darunter „*Tight junction*“ und „*Endocytosis*“. Unter den priorisierten Zielgenen von hsa-mir-934 finden sich nach OMIM-Angaben zwei Zinkfingerproteine (EGR1 und ZZZ3), mit GTF2H1 ein Transkriptionsfaktor und mit ETF1 ein Faktor, welcher bei der Termination der Translation eine Rolle spielt. Die Transkription von GADD45B wird durch Stress (z.B. UV- und γ-Strahlung) induziert.

KLHL15 kodiert für eine Untereinheit einer Proteinphosphatase. Bei SFPQ handelt es sich um einen Spleißfaktor und bei SLC16A1 um einen membrangebundenen Monocarboxylat-Transporter. Für C1orf162 und CHORDC1 ist die Funktion nicht geklärt. Bei TMEM47, dem Zielgen von hsa-mir-4423, handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches insbesondere im Gehirn stark exprimiert wird.

Tabelle 7: Beteiligung der Zielgene von hsa-mir-199a-1 in verschiedenen biologischen Prozessen

Datenbank	Kategorie	n	Priorisierte Zielgene
Reactome	Signal transduction	15	ARHGAP31, ARPC1A, CDK4, CSNK1G2, HEATR3, IER3, MIF, OR8B3, PEA15, PRMT1, SIRT6, TAC1, TRAF1, TUBB6, UBE2D1
	Disease	11	ARPC1A, CD9, CDK4, DYRK1B, EEF2, FEN1, HEATR3, PACS1, RPS29, TUBB6, UBE2D1
	Immune system	9	ARPC1A, EEF2, IRAK2, MIF, RAP2B, TNFRSF12A, TUBB6, UBE2D1, VIM
	Infectious disease	9	ARPC1A, CD9, DYRK1B, EEF2, FEN1, HEATR3, PACS1, RPS29, TUBB6
	Metabolism	9	CSNK1G2, DYRK1B, MLX, NDUFA11, NT5C, PFKP, PNPLA6, PON2, RPS29
GO Biological process	Cellular protein modification process (GO:0006464)	6	CDK4, CSNK1G2, DYRK1B, IRAK2, MAP3K12, RAB8A
GO Molecular function	RNA binding (GO:0003723)	7	ACTN4, EEF2, FXR2, PPIB, PRMT1, VIM, ZNF579

Die potentiellen Zielgene von hsa-mir-199a-1, die laut der Online-Tools Reactome und Enrichr in den angegebenen Kategorien der Datenbanken angereichert sind, sind aufgelistet.

5.4 AUSWAHL UND CHARAKTERISTIKA DER STUDIENKOHORTEN

Im Rahmen der Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe für Neuroimmunologie, zu dem auch die vorliegende Arbeit zur Untersuchung der Expression der MS-assoziierten miRNAs in zirkulierenden B-Zellen zählt, wurden insgesamt 215 Blutproben gesammelt. Nach der Qualitätsprüfung anhand der in Abbildung 11 dargestellten Selektionsschritte wurde ein Satz von 121 Proben für die weiteren Analysen ausgewählt. Von einigen Probanden wurden mehrere Proben entnommen, von denen jeweils die mit der höheren Qualität ausgewählt wurde. Für RRMS-Patienten unter Therapie mit Alemtuzumab wurden jeweils unmittelbar vor und durchschnittlich sieben Monate nach Verabreichung des Medikaments Blutproben entnommen. Proben, für die in diesem Fall keine longitudinale Probensammlung erfolgen konnte, wurden ausgeschlossen. Bei der Durchführung der Transkriptomanalysen mit Microarrays (s. Kapitel 5.8) haben drei Proben die Qualitätskontrolle mit der TAC-Software nicht bestanden und wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die mittlere B-Zell-Reinheit der ausgewählten Proben lag in der Analyse mit dem FACSCalibur bei 85,2 % (n = 3 Proben mit fehlendem Wert). Die Anzahl der angereicherten B-Zellen aus 20 ml Blut lag bei durchschnittlich 4,3 Millionen. Im Mittel wurden die B-Zellen 20 Monate lang in Kryokonservierungsröhrchen in N₂-Tanks gelagert, bevor sie für die B-Zell-Phänotypisierung aufgetaut wurden. Durchschnittlich wurden rund 2.500 ng B-Zell-RNA pro Probe extrahiert. Die RNA-Integrität der Proben war mit einer mittleren RIN von 8,27 gut (n = 38 Proben mit fehlendem Wert). In Tabelle 8 sind Angaben zur Proben- und Probandenzahl, dem Geschlecht, dem Alter, der Erkrankungsdauer, dem anhand der EDSS gemessenen Behinderungsgrad und der Anzahl der Schübe im Vorjahr für die einzelnen Studienkohorten aufgelistet.

Die PPMS-Patienten (n = 13) wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits vier bis 19 Jahre lang

mit Glukokortikosteroid-Pulstherapie (etwa alle drei Monate) behandelt. Die MS-Patienten in der Gruppe „RRMS vor IRT“ wurden vor Umstellung auf eine IRT entweder mit Glatirameracetat (n = 3), Fingolimod (n = 3) oder IFN- β -1b (n = 1) therapiert. Unmittelbar nach der Blutentnahme im Rahmen dieser Studie erhielten die Patienten einen ersten Behandlungszyklus mit Alemtuzumab (n = 4) bzw. Cladribin (n = 3). Die Probanden der Natalizumab-Gruppe hatten bereits bis zu 13 Jahre lang das Medikament erhalten. Die Proben von den Patienten unter Alemtuzumab-Therapie wurden gewonnen nachdem die Patienten einen Behandlungszyklus (n = 17), zwei Zyklen (n = 16), drei Zyklen (n = 4) oder vier Zyklen (n = 1) erhalten hatten. Die Patienten unter Behandlung mit Cladribin haben bis zu zwei Zyklen des Medikaments erhalten. Durchschnittlich hatten die sechs Patienten unter Cladribin-Therapie acht Monate vor der Blutentnahme den letzten Zyklus der Medikamenteneinnahme begonnen.

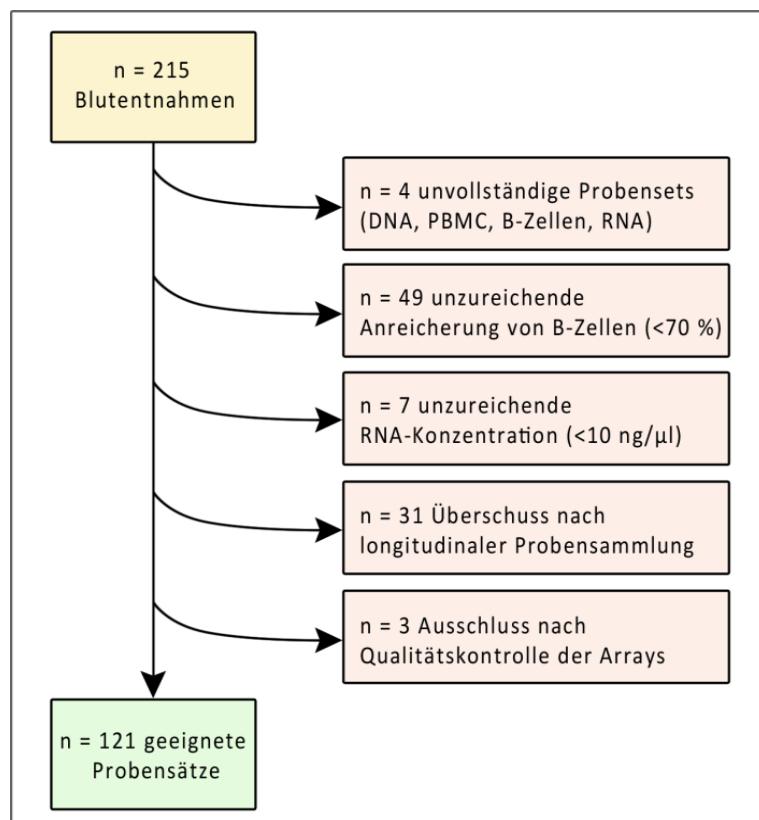


Abbildung 11: Ausgeschlossene und ausgewählte Blutproben für die Studie. Von 215 gesammelten Proben wurden 121 Blutproben aus dem peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Kontrollen für weitere Analysen genutzt. Die Kriterien für den Ausschluss von Proben sind angegeben. PBMC = Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes.

Tabelle 8: Charakteristika der Studienkohorten

Gruppe	Proben ^a n	Individuen ^b n	Geschlecht ^a n(w) n(m)	Alter ^a MW ± SD	Erkrankungsdauer ^a MW ± SD	EDSS-Wert ^b MW ± SD	Schübe im Vorjahr ^b MW ± SD
Gesunde Kontrollen	28	28	17 n(w) 11 n(m)	28,0 ± 8,9	-	-	-
Σ MS	93	63	62 n(w) 31 n(m)	39,2 ± 13,1	8,2 ± 6,6	3,3 (9) ± 1,7	0,2 ± 0,5
PPMS	13	13	5 n(w) 8 n(m)	58,7 ± 9,8	9,7 ± 4,6	4,9 ± 1,7	0,0
RRMS vor IRT	7	7	5 n(w) 2 n(m)	33,7 ± 12,2	2,8 ± 2,8	2,1 ± 0,8	0,9 ± 0,7
RRMS Natalizumab	29	29	16 n(w) 13 n(m)	44,4 ± 9,0	14,0 ± 6,1	3,2 (8) ± 1,7	0,0
RRMS Alemtuzumab	38	15	31 n(w) 7 n(m)	29,2 ± 4,7	4,2 ± 3,5	2,4 ± 1,0	0,7 ± 0,9
RRMS Cladribin	6	6	5 n(w) 1 n(m)	42,0 ± 12,5	8,9 ± 9,0	2,5 (1) ± 0,8	0,7 ± 0,8

Für die Studie wurden insgesamt 121 Blutproben von 91 Probanden gesammelt. Von den Patienten unmittelbar vor IRT wurde stets auch eine Probe nach der Verabreichung von Alemtuzumab bzw. Cladribin gewonnen. ^a Die Angaben zum Geschlecht, dem Alter und der Erkrankungsdauer in Jahren beziehen sich auf die gesammelten Proben. ^b Die Angaben zum EDSS-Wert und der Anzahl der Schübe im Vorjahr beziehen sich auf die Individuen; Für die Patienten unter Alemtuzumab-Therapie wurden hierbei jeweils die Informationen zum Zeitpunkt der jeweils ersten Blutprobe genutzt. Lagen entsprechende Werte nicht für alle Patienten vor, ist in Klammern angegeben, für wie viele Patienten diese Information fehlt. Nur verfügbare Werte sind in die Statistik eingegangen; EDSS = *Expanded Disability Status Scale*; IRT = immunrekonstituierende Therapie; m = männlich; MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung; n = Anzahl; w = weiblich.

5.5 GENOTYPEN VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN

Die Genotypen der 91 Studienteilnehmer für 13 SNPs in miRNA-kodierenden Regionen, acht MS-assozierten *lead* SNPs aus der aktuellsten GWAS-Studie [36] und zwei *tag* SNPs für HLA-Varianten wurden erfolgreich bestimmt (s. Tabelle 9). Die Genotypen der Probanden aus den fünf MS-Kohorten Wurden aufgrund der kleinen Gruppengrößen und der teils niedrigen Allelfrequenzen in einer MS-Gruppe zusammengefasst. Im *Allelic Discrimination*-Plot für den Assay für den MS *lead* SNP rs7975763 war keine klare Unterscheidung der verschiedenen Genotypen möglich und daher konnte dieser Assay nicht ausgewertet werden. Die Allelfrequenzen in der Studienkohorte ähnelten den globalen Allelfrequenzen laut dbSNP 151. Für sechs SNPs wurde das seltenerne Allel nicht detektiert. Für den SNP rs1414273, welcher in der hsa-mir-548ac-kodierenden Region liegt, und für den HLA-DRB1*15:01 *tag* SNP rs3135388 wurden allelische ORs > 2,5 berechnet. Die entsprechenden p-Werte von < 0,05 bestätigen eine signifikante Assoziation zwischen den Risikoallelen und MS. Für die weiteren SNPs konnten in dieser Studienkohorte keine signifikanten Assoziationen zu MS ermittelt werden. Die vorliegende Studie war aber auch nicht explizit für die Untersuchung der Assoziation der ausgewählten SNPs mit MS ausgelegt. Im Vordergrund der Genotypisierung stand die Assoziation der Genotypen zu molekularen Ereignissen, welche die Level der miRNAs (s. Kapitel 5.9) beeinflussen.

Tabelle 9: Genotypverteilung der untersuchten SNPs für die MS-Patienten und Kontrollen

SNP	Kontext	Allelfrequenz (Studie)		Allelfrequenz (dbSNP)		MS RA	Kontrollen (n = 28)			MS (n = 63)			OR	p
		2 RA	1 RA	0 RA	2 RA		2 RA	1 RA	0 RA	2 RA	1 RA	0 RA		
rs41292017	hsa-mir-26a-2	G: 99 %	A: 1 %	G: 98,159 %	A: 1,841 %	A	0	0	28	0	2	61	Inf.	0,478
rs701006	MS <i>lead</i> SNP	A: 41 %	G: 59 %	A: 50,479 %	G: 49,521 %	G	7	15	6	25	29	9	1,56	0,112
rs1005039	hsa-mir-199a-1	C: 98 %	T: 2 %	C: 98,601 %	T: 1,399 %	T	0	1	27	0	3	60	1,34	0,638
rs12609500	MS <i>lead</i> SNP	C: 100 %	T: 0 %	C: 86,781 %	T: 13,219 %	C	28	0	0	63	0	0	NA	1,000
rs1414273	hsa-mir-548ac	C: 89 %	T: 11 %	C: 57,186 %	T: 42,814 %	C	18	10	0	54	8	1	2,52	0,046*
rs73558572	hsa-mir-934	G: 100 %	A: 0 %	G: 98,959 %	A: 1,041 %	G	28	0	0	63	0	0	NA	1,000
rs2807267	MS <i>lead</i> SNP	G: 83 % ^m	T: 17 % ^m	G: 72,848 %	T: 27,152 %	T	NA	2 ^m	9 ^m	NA	4 ^m	21 ^m	0,86	0,748
		G: 73 % ^w	T: 27 % ^w											
rs779704489	hsa-mir-3661	A: 100 %	C: 0 %	A: 98,142 %	C: 1,858 %	C	0	0	28	0	0	63	NA	1,000
rs244656	MS <i>lead</i> SNP	A: 87 %	T: 13 %	A: 72,065 %	T: 27,935 %	A	22	6	0	47	15	1	0,77	0,774
rs521188	hsa-mir-3671	A: 99 %	G: 1 %	A: 89,286 %	G: 10,714 %	G	0	1	27	0	1	62	0,44	0,907
rs2003071	hsa-mir-4252	C: 93 %	T: 7 %	C: 91,072 %	T: 8,928 %	T	0	4	24	0	8	55	0,88	0,708
rs2986736	MS <i>lead</i> SNP	T: 76 %	C: 24 %	T: 61,202 %	C: 38,798 %	C	2	13	13	1	24	38	0,60	0,945
rs77905262	hsa-mir-4304	G: 100 %	C: 0 %	G: 89,307 %	C: 10,693 %	G	28	0	0	63	0	0	NA	1,000
rs78351440	hsa-mir-4304	C: 95 %	A: 5 %	C: 93,986 %	A: 6,014 %	C	26	2	0	55	8	0	0,55	0,870
rs817478	hsa-mir-4423	A: 85 %	C: 15 %	A: 73,207 %	C: 26,793 %	A	21	6	1	47	12	4	0,88	0,684
rs80063010	hsa-mir-4464	G: 100 %	T: 0 %	G: 98,822 %	T: 1,058 %	T	0	0	28	0	0	63	NA	1,000
rs116807677 ³	hsa-mir-4464	G: 100 %	A: 0 %	G: 98,942 %	A: 1,058 %	G	28	0	0	63	0	0	NA	1,000
rs72928038	MS <i>lead</i> SNP	G: 85 %	A: 15 %	G: 92,851 %	A: 7,149 %	A	2	3	23	0	20	43	1,32	0,365
rs7926599	hsa-mir-4492	G: 99 %	C: 1 %	G: 98,511 %	C: 1,489 %	G	28	0	0	61	2	0	0,00	1,000
rs12365699	MS <i>lead</i> SNP	G: 77 %	A: 23 %	G: 93,031 %	A: 6,969 %	G	21	7	0	34	24	5	0,39	0,993
rs6589706	MS <i>lead</i> SNP	G: 52 %	A: 48 %	G: 64,397 %	A: 35,603 %	A	7	15	6	15	28	20	0,79	0,810
rs2844821	HLA-A*02:01	T: 72 %	C: 28 %	T: 76,637 %	C: 23,363 %	C ⁴	3	12	13	5	23	35	0,75	0,257
rs3135388	HLA-DRB1*15:01	G: 74 %	A: 26 %	G: 95,707 %	A: 4,293 %	A	1	6	21	6	27	30	2,69	0,012*

Für 91 Studienteilnehmer erfolgte die Genotypisierung von 23 SNPs. Bei 13 SNPs handelte es sich um Polymorphismen innerhalb oder nahe miRNA-kodierender Sequenzen; bei acht SNPs handelte es sich um GWAS MS *lead* SNPs [36]; zwei SNPs gelten als *tag* SNPs für HLA-Varianten. Die Allelfrequenzen für die Gesamtkohorte und weltweit basierend auf dbSNP Version 151 sind angegeben. Die Allele beziehen sich auf den (+)DNA-Strang. Das MS-Risikoallel (RA) ist angegeben. Die Verteilungen der Genotypen der MS-Erkrankten und der Kontrollen sind dargestellt: 2 RA = homozygot für das Risikoallel, 1 RA = heterozygot, 0 RA = homozygot für das andere Allel. *Odds ratios* (OR) und Fisher-Test p-Werte (p) als Maße für die Assoziation zwischen den Risikoallelen und MS in der Studienkohorte wurden berechnet und signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind hervorgehoben (*). Die miRNA hsa-mir-934 ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Als ^m sind die Werte für die männlichen Studienteilnehmer (haploid) markiert und als ^w die Werte für die weiblichen Studienteilnehmerinnen; ³ rs116807677 wurde statt rs77896647 für die Genotypisierung genutzt, da das Assaydesign für rs77896647 nicht möglich war und beide SNPs in perfektem LD sind. ⁴ Das HLA- und entsprechend das C-Allel des SNPs gelten als protektiv bei MS; MS = Multiple Sklerose; NA = Nicht angebbar. SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus.

5.6 PHÄNOTYPISIERUNG VON B-ZELLEN AUS DEM BLUT VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN

Die prozentualen Anteile von B-Zell-Subpopulationen in den 121 Proben aus den verschiedenen Studienkohorten wurde anhand von Oberflächenmarkern bestimmt (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Vergleich der Häufigkeiten von B-Zell-Subpopulationen zwischen den Studienkohorten

Subpopulation	Gesunde		PPMS		RRMS vor IRT MW ± SD	RRMS Natalizumab MW ± SD		RRMS Alemtuzumab MW ± SD	RRMS Cladribin MW ± SD	p-Wert
	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD		MW ± SD	MW ± SD			
CD27 ⁺ IgD ⁺ naïve BC	41,1 ± 16,7 %	51,5 ± 18,1 %	35,0 ± 11,1 %	31,9 ± 12,4 %	55,4 ± 22,9 %	72,4 ± 5,3 %	1,4e-07*			
CD27 ⁺ IgD ⁺ <i>non-switched memory</i> BC	24,3 ± 7,6 %	25,0 ± 12,2 %	26,3 ± 8,9 %	43,0 ± 15,8 %	7,4 ± 6,1 %	8,9 ± 4,5 %	<2e-16*			
CD27 ⁺ IgD ⁻ <i>switched memory</i> BC	27,0 ± 13,9 %	18,7 ± 11,7 %	31,1 ± 14,5 %	15,5 ± 9,9 %	29,2 ± 19,7 %	14,7 ± 1,9 %	0,0376*			
CD27 ⁺ IgD ⁻ <i>memory</i> BC	7,6 ± 2,9 %	4,7 ± 2,5 %	7,5 ± 2,3 %	9,6 ± 6,9 %	8,0 ± 3,4 %	3,9 ± 1,8 %	0,0078*			
CD24 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ <i>transitionale</i> BC	1,0 ± 0,6 %	1,7 ± 0,9 %	1,3 ± 1,2 %	0,9 ± 1,1 %	2,7 ± 2,3 %	7,4 ± 5,5 %	3,8e-11*			
CD24 ⁻ CD38 ⁺⁺ <i>Plasmablasten</i>	8,5 ± 5,9 %	4,9 ± 2,7 %	10,0 ± 6,9 %	2,3 ± 1,9 %	12,2 ± 11,2 %	4,8 ± 1,4 %	0,0018*			
CD21 _{low} CD38 _{low} BC	2,2 ± 1,8 %	9,0 ± 11,3 %	2,4 ± 1,3 %	3,5 ± 1,7 %	1,1 ± 0,8 %	2,6 ± 3,6 %	0,0001*			
CD23 ⁺ BC	12,4 ± 8,3 %	22,5 ± 11,2 %	11,1 ± 12,0 %	7,7 ± 6,0 %	10,5 ± 7,5 %	25,6 ± 10,6 %	1,6e-06*			

Durchflusszytometrisch wurden die Anteile von acht B-Zellsubpopulationen an angereicherten CD19⁺ B-Zellen aus 121 Blutproben von Gesunden und MS-Patienten mit verschiedenen Verlaufsformen und unter verschiedenen Therapien bestimmt. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der prozentualen Anteile (MW ± SD) sind angegeben. Für jede der Subpopulationen ist die Studienkohorte mit dem niedrigsten (blau) und dem höchsten Wert (gelb) hervorgehoben. Die F-Test p-Werte für den Gruppenvergleich sind adjustiert nach Alter und Geschlecht (ANCOVA). * In allen Fällen war der Effekt der Zugehörigkeit zu einer Studienkohorte signifikant für die Unterschiede in den Anteilen der Subpopulationen ($p < 0,05$). Das Alter und das Geschlecht zeigten hingegen stets keine signifikanten Assoziationen zu den prozentualen Häufigkeiten der Subpopulationen. BC = B-Zellen; IRT = Immunrekonstituierende Therapien; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubförmig remittierende MS.

Insgesamt stellten die naiven B-Zellen mit 31,9 % bis 72,4 % den größten Anteil, während *transitionale* und CD21_{low} CD38_{low} B-Zellen mit den niedrigsten Frequenzen auftraten. Für die prozentualen Anteile für alle acht Subpopulationen wurden signifikante Unterschiede zwischen den Studienkohorten festgestellt. Die Anteile der CD27⁺ IgD⁺ *non-switched memory* B-Zellen, derjenigen Population mit dem niedrigsten p-Wert für den Effekt der Gruppenzugehörigkeit, sind in Abbildung 12 dargestellt. Die p-Werte für die entsprechenden paarweisen Vergleiche zwischen den Studienkohorten sind in Tabelle 11 aufgelistet. Insbesondere für die drei RRMS-Kohorten unter Therapie mit IRTs oder Natalizumab waren deutliche Unterschiede zu den anderen Gruppen ersichtlich.

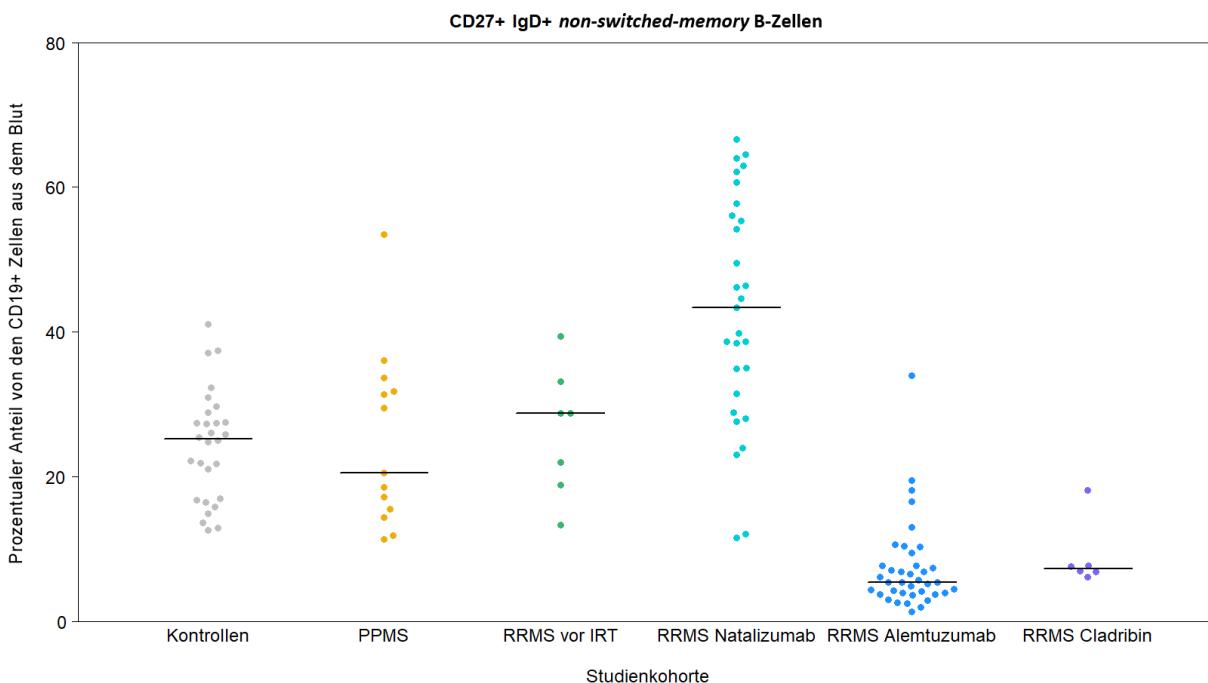


Abbildung 12: Anteil der *non-switched memory* B-Zell-Subpopulation im Vergleich der Studienkohorten. Prozentuale Anteile der Subpopulation an allen CD19⁺ Zellen in den B-Zell-Proben aus sechs Studienkohorten sind in einem Beeswarm-Plot dargestellt. Die Mediane sind durch horizontale Linien eingezeichnet. Bei den gesunden Kontrollen machten die *non-switched memory* B-Zellen rund 24 % der CD19⁺ Zellen aus. Dieser Anteil war bei PPMS-Patienten leicht und bei RRMS-Patienten unter IRT mit Alemtuzumab oder Cladribin stark verringert. In der RRMS-Gruppe vor IRT und unter Natalizumab-Behandlung waren die Anteile hingegen erhöht. IRT = Immunrekonstituierende Therapien; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubförmig remittierende MS.

Tabelle 11: Paarweise Vergleiche auf signifikante Unterschiede der Anteile von *non-switched memory* B-Zellen zwischen den Studienkohorten

	PPMS	RRMS vor IRT	RRMS Natalizumab	RRMS Alemtuzumab	RRMS Cladribin
Kontrollen	0,9160	0,9999	< 0,001*	< 0,001*	0,0054*
PPMS	-	0,8950	< 0,001*	0,1099	0,1654
RRMS vor IRT	-	-	0,0171*	< 0,001*	0,0175*
RRMS Natalizumab	-	-	-	< 0,001*	< 0,001*
RRMS Alemtuzumab	-	-	-	-	1,0000

Die p-Werte (paarweise Tukey *post-hoc* Tests, adjustiert nach Alter und Geschlecht) sind angegeben. Signifikante Unterschiede im Anteil der CD27⁺ IgD⁺ *non-switched memory* B-Zellen zwischen den Studienkohorten ($p < 0,05$) sind mit einem * markiert. Der Anteil der Subpopulation im peripheren Blut in den RRMS-Kohorten unter Therapie unterschied sich signifikant vom entsprechenden Anteil der Kontrollen und den RRMS-Patienten vor IRT. Während der Anteil unter Therapie mit Natalizumab deutlich höher war (Mittelwert = 43,0 %), war er unter Behandlung mit Alemtuzumab (7,4 %) und Cladribin (8,9 %) deutlich geringer. IRT = Immunrekonstituierende Therapien; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubförmig remittierende MS.

5.7 MICRORNA-EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE IN B-ZELLEN VON MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN

Die Expression von 22 der 28 untersuchten miRNAs und IsomiRs relativ zur Referenz-miRNA hsa-miR-191-5p wurde in $n = 120$ B-Zell-Proben erfolgreich bestimmt (s. Tabelle 12 und Abbildung 13). Für sechs Assays hatte die automatisierte *Threshold*-Berechnung keinen Erfolg und sie wurden daher aus der weiteren Analyse ausgeschlossen: hsa-miR-934-5p|{isomiR}|15_34|, hsa-miR-3661-5p|{hsa-miR-3661}|21_42| und |{isomiR}|21_41|, hsa-miR-3671-5p|{isomiR}|4_20| und |{isomiR}|4_20_C| und hsa-miR-4252-3p|{hsa-miR-4252}|35_53|. Für eine Probe der Gruppe „RRMS Alemtuzumab“ konnten keine miRNA-Expressionsdaten ermittelt werden, da nicht genug RNA für die Messung vorhanden war. Die Referenz-miRNA wurde in allen 120 Proben erfolgreich detektiert (C_T -Werte < 20). Der mittlere C_T -Wert und die Standardabweichung für hsa-miR-191-5p lagen bei $16,242 \pm 1,010$. Relativ hierzu wurden die ΔC_T -Werte berechnet, wobei niedrige Werte eine hohe Expression der gemessenen Moleküle anzeigen.

Zehn der 22 in Tabelle 12 gelisteten miRNAs und IsomiRs konnten in allen Proben detektiert werden (das heißt C_T -Wert stets < 45). Für die anderen zwölf miRNAs wurden die *nondetects* imputiert. Die höchsten mittleren Expressionswerte wurden für eine 3' Isoform von hsa-miR-26a-5p verzeichnet. Für die miRBase-gelistete Form wurden die zweithöchsten Werte erhoben. Auch für die IsomiR von hsa-miR-4492-3p und sowohl die miRBase-gelistete und die IsomiR von hsa-miR-199a-3p wurden mittlere ΔC_T -Werte < 10 und damit relativ hohe Expressionswerte verzeichnet. Die niedrigsten Expressionswerte wurden für die miRBase-gelisteten hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-548ac, hsa-miR-934, hsa-miR-3671, für die 5p-Formen von hsa-miR-4423 und für hsa-miR-4464, insbesondere die 3p-Isoform, die nur in $n = 7$ Proben gemessen wurde, bestimmt.

Die detaillierte Betrachtung der Expression der ausgewählten miRNA-Isoformen lieferte weitere Erkenntnisse. Die 3' Isoformen von hsa-miR-26a-2-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-4423-3p und -5p wurden in den untersuchten Probanden auf genauso hohem oder sogar höherem Level als die miRBase-annotierten Formen detektiert. Die 3' Isoformen sind jeweils nur um eine Base kürzer. Eine um vier Nukleotide versetzte reife miRNA-Sequenz wurde für hsa-miR-4464-5p nachgewiesen, wenn auch auf niedrigerem Expressionsniveau als die kanonische Form. Für hsa-mir-548ac, hsa-mir-934 und hsa-mir-4304 ist bei miRBase [81] nur für einen Strang eine reife miRNA gelistet. In der vorliegenden Studie konnten auch für den anderen Strang reife Moleküle gemessen werden.

Mittels linearer Modelle wurden Effekte der Studienkohorte, des Geschlechts und des Alters auf die Expression der Moleküle ermittelt. Das Geschlecht hatte nur im Fall von hsa-miR-934-3p einen signifikanten Effekt auf die Expression (p -Wert = 0,0348). Der mittlere ΔC_T -Wert für die Gruppe der Frauen lag für dieses Molekül bei 29,517, während er für die Gruppe der Männer mit 28,402 etwas

niedriger lag. Für das Alter wurde für die Isoform von hsa-miR-4423-5p ein signifikanter Einfluss (p -Wert $< 0,001$) berechnet. Ein β -Koeffizient von 0,0006 weist auf eine Tendenz zur geringeren Expression des Moleküls mit steigendem Alter hin. Ansonsten wurden keine signifikanten Effekte des Geschlechts oder Alters auf die Expression der miRNAs und IsomiRs verzeichnet.

Für die zehn miRNAs, für die die niedrigsten p -Werte für den Effekt der Studienkohorte auf die Expression (neun miRNAs davon mit $p < 0,01$) ermittelt wurden, ist ihre Expression in den sechs Studienkohorten in Abbildung 13 dargestellt. Dazu zählen die miRBase-gelisteten reifen Moleküle und Isoformen von hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-199a-5p/-3p und hsa-miR-4304 sowie die miRBase-gelistete hsa-miR-4464-5p und die IsomiR von hsa-miR-4492-3p. Für die verschiedenen Moleküle, die jeweils von der gleichen Vorläufer-Sequenz abstammen, ergaben sich ähnliche Expressionsmuster über die sechs Studienkohorten. Für hsa-miR-26a-5p gibt es neben dem Genlocus von hsa-mir-26a-2 auf Chromosom 12 auch den hsa-mir-26a-1-Genlocus auf Chromosom 3. Aus beiden Loci wird laut miRBase [81] das gleiche reife -5p-Molekül gebildet. Auch für hsa-mir-199a gibt es zwei Loci (199a-1 auf Chromosom 19 und 199a-2 auf Chromosom 1) und aus beiden werden die gleichen -5p und -3p-miRNAs gebildet [81]. Für beide hsa-miR-26a-2-5p-Moleküle war die Expression bei RRMS-Patienten unter Behandlung mit Natalizumab signifikant höher als in den Kontrollen und in den Patienten, die mit Alemtuzumab therapiert wurden. Auch für die vier reifen hsa-mir-199a-Moleküle ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Natalizumab- und der Alemtuzumab-Kohorte; Die miRNAs und IsomiRs waren in letzterer Kohorte höher exprimiert ($p < 0,001$). Die reifen hsa-miR-199a-3p-miRNAs wiesen höhere Expressionslevel als die -5p-miRNAs auf. Für letztere war die um eine Base kürzere 3' IsomiR in allen Kohorten deutlich höher exprimiert als die miRBase-gelistete Form, während beide -3p-Moleküle ähnlich stark exprimiert waren. Hsa-miR-4304-5p und -3p waren ebenfalls ähnlich stark exprimiert. Die Expression dieser beiden Moleküle war in der Cladribin-Kohorte gegenüber der Natalizumab- und der Alemtuzumab-Gruppe signifikant erhöht. Für hsa-miR-4464-5p und für hsa-miR-4492-3p deuten p -Werte von 0,0089 und 0,0034 ebenfalls auf die stärksten Unterschiede im Vergleich der Cladribin- und der Natalizumab-Kohorten hin. Für alle zehn in Abbildung 13 gezeigten miRNA-Moleküle zeigte sich eine differentielle Expression in mindestens einer der drei RRMS-Gruppen unter Therapie mit Natalizumab, Alemtuzumab oder Cladribin. Aufgrund der festgestellten Unterschiede in der Expression reifer miRNA-Moleküle in Abhängigkeit vom Geschlecht, Alter und der Gruppenzugehörigkeit (MS-Behandlung) wurden diese Variablen in den nachfolgenden statistischen Analysen (z.B. eQTL) stets in den linearen Modellen mit berücksichtigt.

Tabelle 12: Relative Expression von reifen miRNAs in B-Zellen von MS-Patienten und Kontrollen

miRNA Assay	Kontrollen MW ± SD (n = 28)	PPMS MW ± SD (n = 13)	RRMS vor IRT MW ± SD (n = 7)	RRMS Natalizumab MW ± SD (n = 29)	RRMS Alemtuzumab MW ± SD (n = 37)	RRMS Cladribin MW ± SD (n = 6)	p-Wert
hsa-miR-26a-5p {hsa-miR-26a-2} 14_35	2,062 ± 0,346	1,990 ± 0,545	1,982 ± 0,292	1,756 ± 0,432	2,158 ± 0,438	2,272 ± 0,265	0,0014
hsa-miR-26a-2-3p {hsa-miR-26a-2} 52_73	13,317 ± 1,558 (1)	13,969 ± 1,074 (5)	14,334 ± 1,394	13,315 ± 0,986 (1)	13,556 ± 0,798 (2)	13,181 ± 0,886 (1)	0,0418
hsa-miR-26a-2-5p {isomiR} 14_34	0,686 ± 0,431	0,578 ± 0,658	0,697 ± 0,487	0,356 ± 0,460	0,868 ± 0,560	0,765 ± 0,077	0,0011
hsa-miR-199a-5p {hsa-miR-199a-1} 6_28	21,204 ± 5,303 (15)	20,758 ± 5,398 (7)	21,119 ± 6,276 (4)	25,296 ± 5,317 (20)	17,788 ± 4,582 (11)	18,282 ± 4,622 (2)	0,0177
hsa-miR-199a-3p {hsa-miR-199a-1} 47_68	7,982 ± 1,535	8,120 ± 1,430	6,883 ± 1,831	8,873 ± 1,245	6,706 ± 2,031	7,717 ± 1,888	0,0006
hsa-miR-199a-5p {isomiR} 6_27	12,119 ± 2,270	12,376 ± 1,973 (1)	10,419 ± 1,883	12,587 ± 1,641	10,197 ± 2,159 (1)	12,453 ± 3,237	0,0005
hsa-miR-199a-3p {isomiR} 47_67	8,147 ± 1,252	8,242 ± 0,993	7,431 ± 1,596	8,748 ± 0,878	7,170 ± 1,737	8,112 ± 1,762	0,0008
hsa-miR-548ac-3p {hsa-miR-548ac} 53_74	25,954 ± 5,315 (21)	28,160 ± 4,717 (11)	25,558 ± 5,820 (5)	22,943 ± 5,079 (15)	25,427 ± 5,378 (26)	40,484 ± 1,195 (6)	0,8477
hsa-miR-548ac-5p {isomiR} 17_37	29,920 ± 5,064 (22)	44,075 ± 0,949 (13)	30,999 ± 6,018 (6)	34,570 ± 4,774 (27)	30,581 ± 5,791 (31)	28,281 ± 6,142 (5)	0,8165
hsa-miR-934-5p {hsa-miR-934} 15_36	29,395 ± 5,611 (23)	42,225 ± 0,949 (13)	29,798 ± 5,898 (6)	31,755 ± 5,089 (26)	30,564 ± 4,464 (31)	41,494 ± 1,195 (6)	0,6105
hsa-miR-934-3p {isomiR} 51_72	27,578 ± 4,825 (21)	31,396 ± 4,308 (12)	29,340 ± 4,654 (6)	30,162 ± 4,907 (25)	29,215 ± 4,839 (30)	25,645 ± 4,740 (4)	0,9388
hsa-miR-3671-3p {hsa-miR-3671} 60_81	33,755 ± 1,424 (27)	37,041 ± 0,949 (13)	23,748 ± 4,792 (4)	31,334 ± 2,714 (27)	27,028 ± 4,288 (29)	24,113 ± 4,735 (4)	0,1381
hsa-miR-4304-5p {hsa-miR-4304} 11_27	10,720 ± 0,716	10,115 ± 0,981	10,634 ± 0,813	10,841 ± 0,568	10,916 ± 0,844	9,266 ± 1,127	3,3e-0
hsa-miR-4304-3p {isomiR} 36_53	10,742 ± 0,722	10,381 ± 1,174	10,838 ± 0,982	11,688 ± 0,820	11,008 ± 0,857	9,843 ± 0,821	8,2e-0
hsa-miR-4423-5p {hsa-miR-4423} 13_34	21,192 ± 4,594 (13)	23,503 ± 4,569 (9)	24,878 ± 4,680 (3)	19,250 ± 3,640 (7)	22,353 ± 4,691 (21)	20,206 ± 4,599 (2)	0,9757
hsa-miR-4423-3p {hsa-miR-4423} 49_69	13,400 ± 1,000	13,087 ± 1,573	13,571 ± 0,999	13,563 ± 0,847	13,518 ± 0,947	12,639 ± 0,673	0,0413
hsa-miR-4423-5p {isomiR} 13_33	19,694 ± 3,876 (11)	21,690 ± 4,490 (8)	21,760 ± 4,649 (4)	18,486 ± 3,340 (5)	21,514 ± 3,578 (18)	25,731 ± 2,641 (5)	0,0652
hsa-miR-4423-3p {isomiR} 49_68	13,030 ± 0,991	12,532 ± 1,089	13,210 ± 0,970	13,304 ± 0,646	13,144 ± 0,960	12,627 ± 0,706	0,0227
hsa-miR-4464-5p {hsa-miR-4464} 12_32	15,908 ± 1,285	15,109 ± 1,059	16,546 ± 1,361	16,303 ± 1,038	15,881 ± 0,974	14,547 ± 0,997	0,0063
hsa-miR-4464-5p {isomiR} 16_36	18,660 ± 3,729 (9)	20,001 ± 4,205 (7)	16,707 ± 2,516 (1)	18,240 ± 3,825 (7)	17,523 ± 3,698 (7)	20,728 ± 3,992 (3)	0,8577
hsa-miR-4464-3p {isomiR} 62_80	42,234 ± 0,939 (28)	29,563 ± 5,647 (11)	42,454 ± 0,807 (7)	32,295 ± 5,208 (26)	34,706 ± 4,214 (35)	41,012 ± 1,195 (6)	0,8342
hsa-miR-4492-3p {isomiR} 59_75	6,339 ± 1,258	5,853 ± 1,266	7,012 ± 0,888	7,136 ± 1,101	6,836 ± 0,983	5,243 ± 0,790	0,0008

Die Mittelwerte und Standardabweichungen (MW ± SD) der ΔC_{-T} -Werte als Maß der Expression von reifen miRNAs und isomiRs relativ hsa-miR-191-5p für 120 B-Zell-Proben von Studienteilnehmern aus sechs Kohorten sind angegeben. Konnten die reifen miRNAs nicht in allen Proben 45 PCR-Zyklen detektiert werden, ist in Klammern angegeben, in wie vielen Proben das Molekül nicht nachgewiesen werden konnte. ΔC_{-T} -Werte imputiert wurden. Der p-Wert gibt an, ob es einen Unterschied in der miRNA-Expression zwischen den Gruppen gibt (F-Test, ANCO adjustiert für Alter und Geschlecht). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem * markiert. Die Kohorten mit den niedrigsten (blau) und höchsten Werten (gelb) sind hervorgehoben. IRT = Immunrekonstituierende Therapien; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubfördernd remittierende MS.

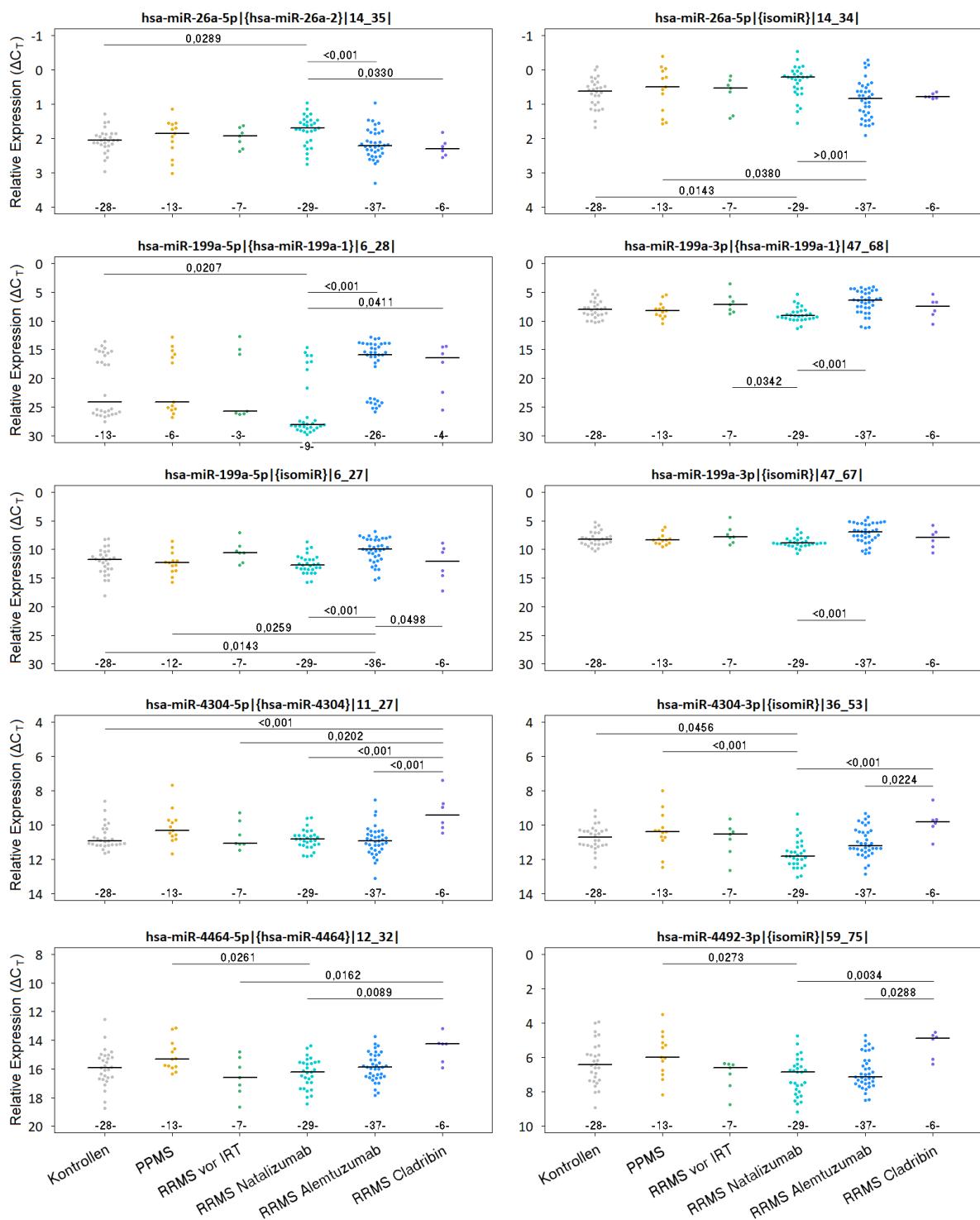


Abbildung 13: Differentiell exprimierte miRNAs in B-Zellen im Vergleich der Studienkohorten. Die ΔC_T -Werte und die Mediane der ΔC_T -Werte von zehn miRNAs und IsomiRs aus fünf miRNA-kodierenden Loci in den sechs Studienkohorten sind visualisiert. Die y-Achse ist invers dargestellt, sodass hoch liegende Punkte eine hohe Expression anzeigen. P-Werte $< 0,05$ aus paarweisen Tukey *post-hoc* Analysen sind angegeben. Über der x-Achse steht jeweils die Anzahl der Proben, in denen das Moleköl innerhalb von 45 PCR-Zyklen nachgewiesen werden konnte. Jeweils für die zwei Assays zur Quantifizierung von hsa-miR-26a-5p, von hsa-miR-199a-3p und von hsa-miR-4304-5p und -3p ergaben sich sehr ähnliche Expressionsmuster über die sechs Kohorten. IRT = Immunre-konstituierende Therapien; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubförmig remittierende MS.

5.8 TRANSKRIPTOMPROFILE VON B-ZELLEN AUS MS-PATIENTEN UND KONTROLLEN

Die Expression von an der miRNA-Biogenese beteiligten Genen, der miRNA *host* Gene und der in Kapitel 5.3 identifizierten Zieltranskripte der MS-assoziierten miRNAs in den 121 B-Zell-Proben wurde mittels Transkriptomanalyse bestimmt. Für die Hybridisierungs-, Positiv- und Negativkontrollen auf den Clariom D-Arrays wurde die automatische Qualitätskontrolle der Software TAC stets bestanden. Die Vergleichbarkeit der Signalintensitäten der 121 Arrays war gut (Mediane zwischen 5,21 und 6,04). In der PCA des gesamten Transkriptomdatensatzes konnten keine Ausreißer nachgewiesen werden (Abbildung 14). Die sechs Proben der Cladribin-Gruppe bildeten einen engen Cluster in allen drei Dimensionen der PCA. Die Proben der RRMS-Patienten unter Natalizumab-Therapie bildeten einen Cluster etwas abseits von den anderen Proben (Hauptkomponente 1). Für die weiteren vier Studienkohorten ergaben sich keine Auf trennungen in dieser Dimension. Die Proben der Gruppe „RRMS Alemtuzumab“ lagen tendentiell eher im oberen Teil der Hauptkomponente 2, während die Kontrollproben eher im unteren Teil lagen. Für die Kohorten „PPMS“ und „RRMS vor IRT“ ergaben sich größere Streuungen der Datenpunkte im PCA-Plot.

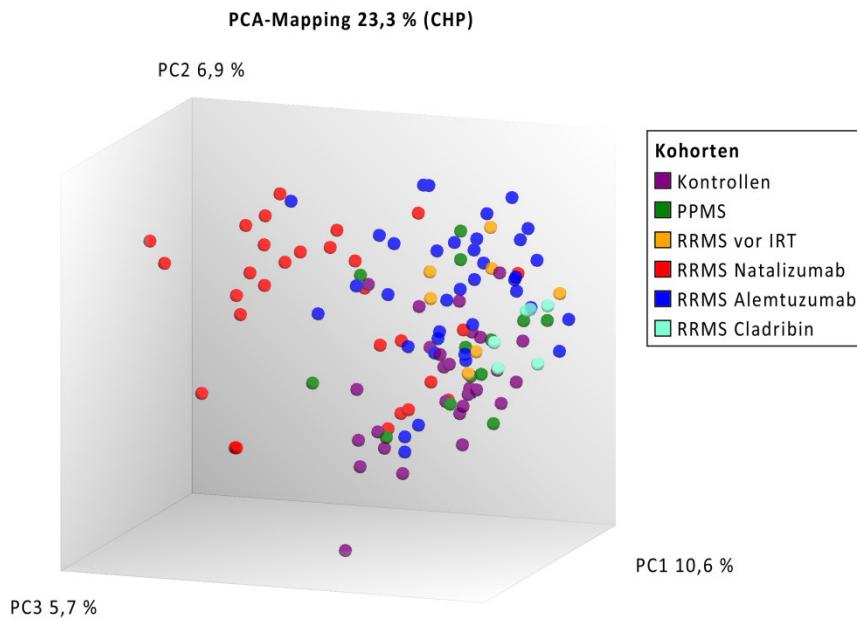


Abbildung 14: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomprofile von B-Zellen von MS-Patienten und Kontrollen. Der PCA-Plot wurde in der Software TAC für $n = 121$ Microarrays erstellt. Durch drei Hauptkomponenten (*principal component*; PC) können 23,3 % der Variabilität der Daten beschrieben werden. Für die Proben der Kohorten „Kontrollen“, „RRMS Alemtuzumab“ und insbesondere „RRMS Natalizumab“ wurde eine Tendenz zur Clusterbildung in unterschiedlichen Regionen des Plots gezeigt. Die sechs Proben aus der Cladribin-Gruppe liegen nah beieinander. Die Proben der anderen beiden Kohorten liegen stärker gestreut vor. Insgesamt liegen die Microarraydaten eng beieinander. Es sind keine offensichtlichen Ausreißer zu erkennen. IRT = Immunrekonstituierende Therapien; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubförmig remittierende MS.

Die Transkriptlevel von den an der miRNA-Biogenese beteiligten Genen AGO2, DROSHA, DGCR8, DICER1, TARBP2 und XPO5 wurden überprüft (s. Tabelle S 18). Für diese sechs Gene betragen die Interquartilsabstände der Expressionswerte stets $< 0,73$. Die mittleren Tukey-biweight log2 Signalintensitätswerte lagen für DROSHA (prozessierende Untereinheit von Microprocessor) bei $9,46 \pm 0,42$ und für DICER1 (zweites Spaltenzym im Rahmen der miRNA-Biogenese) bei $10,53 \pm 0,45$.

Die Expressionswerte für die fünf *host* Gene, in deren Introns MS-assozierte miRNAs kodiert werden, sind in Tabelle 13 gelistet. Für das Transkript des nicht-Protein-kodierenden AL132996.1-Gens, innerhalb dessen hsa-mir-4464 kodiert wird, gab es auf den Clariom D-Arrays keine Sonden. Für CD58, als *host* Gen von hsa-mir-548ac, CTDSP2 (hsa-mir-26a-2) und JAK1 (hsa-mir-3671) ergaben sich laut F-Test signifikante Effekte der Gruppenzugehörigkeit auf die mRNA-Expression. Außerdem zeigte ein p-Wert von 0,0190 einen Einfluss des Alters auf die Expression von CD58 an. Der β -Koeffizient für den Einfluss des Alters lag bei $\beta = 0,0187$. Ansonsten wurden keine signifikanten Effekte des Alters oder des Geschlechts auf die Expression der Gene verzeichnet. In paarweisen Tukey *post-hoc* Analysen, adjustiert nach dem Alter und dem Geschlecht, konnten für CTDSP2 und JAK1 jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen bestätigt werden. Für die Expression von CD58 ergaben sich vier signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten: Die Expression des Moleküls war in der Gruppe „RRMS Natalizumab“ höher als in den beiden Gruppen „RRMS Alemtuzumab“ ($p = 0,0465$) und „RRMS Cladribin“ ($p = 0,0036$). Bei den gesunden Kontrollen war die Expression von CD58 ebenfalls signifikant höher als in den RRMS-Patienten unter Behandlung mit Alemtuzumab ($p < 0,001$) und Cladribin ($p = 0,0011$). PITPNM2 und VGLL1 waren in den B-Zellen niedrig exprimiert.

Für die MS-assozierte hsa-mir-199a-1, für die ein Einfluss des SNPs rs1005039 auf die Prozessierung und eine differentielle Expression der reifen Moleküle zwischen den Studienkohorten gezeigt werden konnte, wurde die Expression der 60 identifizierten Zielgene betrachtet. Für 32 der Gene konnte mittels F-Test (ANCOVA, adjustiert für das Alter und das Geschlecht) ein signifikanter Einfluss der Gruppe auf die Expressionswerte gezeigt werden (Tabelle S 19). Für 21 dieser Gene war die Expression in der Gruppe der RRMS-Patienten unter Therapie mit Natalizumab am höchsten, während die Expression in 17 Fällen bei den RRMS-Patienten, welche mit Cladribin behandelt wurden, am niedrigsten war. Die restlichen Höchst- und Niedrigstwerte waren gleichmäßig zwischen den weiteren vier Kohorten verteilt. Außerdem ergab sich durch das Geschlecht ein Effekt auf die Expression von EPSTI1 ($p = 0,0375$) und TMOD2 ($p = 0,0135$). Die EPSTI1- bzw. TMOD2-Expression lag bei den weiblichen Studienteilnehmerinnen mit mittleren log2 Signalintensitätswerten von 9,502 bzw. 7,630 etwas höher als bei den männlichen Studienteilnehmern mit 9,249 bzw. 7,521.

Tabelle 13: Expression von miRNA host Genen in B-Zellen von MS-Patienten und Kontrollen

Gen	Kontrollen		PPMS MW ± SD	RRMS vor IRT MW ± SD	RRMS Natalizumab MW ± SD	RRMS Alemtuzumab MW ± SD	RRMS Cladribin MW ± SD	p-Wert
	MW ± SD	MW ± SD						
CD58	9,13 ± 0,78	8,76 ± 0,67	9,02 ± 0,39	9,24 ± 0,56	8,41 ± 0,84	8,10 ± 0,52	3,3e-06*	
CTDSP2	10,77 ± 0,41	10,77 ± 0,44	10,32 ± 0,47	10,61 ± 0,36	10,40 ± 0,52	10,65 ± 0,55	0,0442*	
JAK1	15,07 ± 0,40	14,77 ± 0,43	15,14 ± 0,34	15,22 ± 0,33	14,88 ± 0,30	14,82 ± 0,37	0,0044*	
PITPNM2	4,58 ± 0,50	4,74 ± 0,49	4,70 ± 0,51	4,41 ± 0,41	4,79 ± 0,62	4,56 ± 0,34	0,2424	
VGLL1	3,10 ± 0,21	2,98 ± 0,19	3,06 ± 0,26	3,03 ± 0,26	3,07 ± 0,21	2,96 ± 0,16	0,6915	

Die Expressionswerte für die fünf miRNA host Gene in n = 121 B-Zell-Proben von Studienteilnehmern aus sechs Kohorten sind gezeigt. Die Tukey-biweight Mittelwerte und Standardabweichungen (MW ± SD) der entsprechenden log2 Signalintensitätswerte sind angegeben. Der p-Wert gibt an, ob es einen signifikanten Unterschied in der Genexpression zwischen den Studienkohorten gibt (F-Test, lineares Modell, adjustiert für Alter und Geschlecht). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind mit einem * markiert. Die Gruppen mit den niedrigsten (blau) und den höchsten Werten (gelb) sind hervorgehoben. IRT = Immunrekonstituierende Therapien; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubförmig remittierende MS.

5.9 ASSOZIATIONEN ZWISCHEN DEN SNP-GENOTYPEN, MICRORNA-EXPRESSIONS- UND TRANSKRIPTOMDATEN

eQTL-Analysen

Für die 22 gemessenen miRBase-gelisteten miRNAs und Isoformen, welche aus neun miRNA-kodierenden Sequenzen stammen (Tabelle 12), sowie für die fünf miRNA host Gene (Tabelle 13) wurden Assoziationen mit den Genotypen von zwölf SNPs, für die beide Allele in der Studienkohorte nachgewiesen werden konnten (Tabelle 9), untersucht. Für drei reife miRNA-Moleküle und für zwei Gene wurden konsistent signifikante Assoziationen zwischen der Expression und dem Genotyp festgestellt (s. Tabelle 14 sowie Abbildung 15). Für die miRBase-annotierte Form sowie für die IsoMiR von hsa-miR-4423-5p konnte eine signifikant niedrigere Expression im Zusammenhang mit dem MS-Risikoallel des SNPs, welcher in der flankierenden Region (im CNNC-Motiv) der miRNA-kodierenden Sequenz liegt, gezeigt werden. CTDSP2 und hsa-mir-26a-2 sowie VGLL1 und hsa-mir-934 sind jeweils in einer gemeinsamen genetischen Region lokalisiert, wobei Transkription und miRNA-Prozessierung potentiell unabhängig voneinander von SNPs beeinflusst werden können. Für CTDSP2 war der Genotyp rs41292017GG (n = 118) gegenüber GA (n = 3) mit einer erhöhten Genexpression in der Studienkohorte assoziiert. Diese eQTL-Assoziation spiegelte sich jedoch nicht auch für die Expression der reifen Moleküle von hsa-mir-26a-2, welches in Intron 5 von CTDSP2 kodiert wird, wider. Der SNP rs41292017 ist in der flankierenden Region (CNNC-Motif) von hsa-mir-26a-2 lokalisiert. Für die miRBase-annotierte Form von hsa-miR-26a-2-3p war das MS-Risikoallel rs701006G mit einer höheren Expression von der rund 112 kb entfernten miRNA assoziiert.

Tabelle 14: Assoziationen von SNPs mit miRNA- & host Genexpression

SNP	miRNA bzw. Gentranskript	2 RA MW ± SD		1 RA MW ± SD		0 RA MW ± SD		p-Wert
		NA	9,505 ± 0,812 (3)	NA	13,690 ± 0,828 (2)	NA	10,583 ± 0,428 (118)	
rs41292017	CTDSP2	NA	9,505 ± 0,812 (3)	NA	13,690 ± 0,828 (2)	NA	10,583 ± 0,428 (118)	3,4e-05*
rs41292017	hsa-miR-26a-2-3p {hsa-miR-26a-2} 52_73	NA	9,505 ± 0,812 (3)	NA	13,690 ± 0,828 (2)	NA	10,583 ± 0,428 (118)	0,4343
rs41292017	hsa-miR-26a-2-5p {isomiR} 14_34	NA	9,505 ± 0,812 (3)	NA	0,780 ± 0,847 (2)	NA	0,653 ± 0,529 (118)	0,5059
rs41292017	hsa-miR-26a-5p {hsa-miR-26a-2} 14_35	NA	9,505 ± 0,812 (3)	NA	2,067 ± 0,641 (2)	NA	2,015 ± 0,641 (118)	0,5902
rs701006	CTDSP2	10,611 ± 0,438 (41)	10,559 ± 0,507 (58)	NA	10,553 ± 0,426 (22)	NA	10,553 ± 0,426 (22)	0,9869
rs701006	hsa-miR-26a-2-3p {hsa-miR-26a-2} 52_73	13,277 ± 1,209 (41)	13,521 ± 1,072 (57)	NA	13,932 ± 1,123 (22)	NA	13,932 ± 1,123 (22)	0,0104*
rs701006	hsa-miR-26a-2-5p {isomiR} 14_34	0,615 ± 0,445 (41)	0,665 ± 0,564 (57)	NA	0,705 ± 0,605 (22)	NA	0,705 ± 0,605 (22)	0,6214
rs701006	hsa-miR-26a-5p {hsa-miR-26a-2} 14_35	2,010 ± 0,407 (41)	2,010 ± 0,446 (57)	NA	2,041 ± 0,499 (22)	NA	2,041 ± 0,499 (22)	0,4509
rs1005039	hsa-miR-199a-3p {hsa-miR-199a-1} 47_68	NA	6,712 ± 2,229 (5)	NA	7,785 ± 1,822 (115)	NA	7,785 ± 1,822 (115)	0,1580
rs1005039	hsa-miR-199a-3p {isomiR} 47_67	NA	6,712 ± 2,229 (5)	NA	7,075 ± 1,789 (5)	NA	7,996 ± 1,462 (115)	0,2090
rs1005039	hsa-miR-199a-5p {hsa-miR-199a-1} 6_28	NA	6,712 ± 2,229 (5)	NA	17,985 ± 5,635 (5)	NA	21,069 ± 5,766 (115)	0,7023
rs1005039	hsa-miR-199a-5p {isomiR} 6_27	NA	6,712 ± 2,229 (5)	NA	10,479 ± 2,512 (5)	NA	11,633 ± 2,297 (115)	0,3546
rs1414273	CD58	8,865 ± 0,765 (96)	8,993 ± 0,897 (21)	NA	8,946 ± 1,493 (4)	NA	8,946 ± 1,493 (4)	0,7295
rs1414273	hsa-miR-548ac-3p {hsa-miR-548ac} 53_74	26,368 ± 6,099 (95)	25,972 ± 6,334 (21)	NA	17,409 ± 0,646 (4)	NA	17,409 ± 0,646 (4)	0,0707
rs1414273	hsa-miR-548ac-5p {isomiR} 17_37	33,591 ± 6,473 (95)	29,658 ± 6,407 (21)	NA	29,370 ± 7,840 (4)	NA	29,370 ± 7,840 (4)	0,8194
rs2807267	VGLL1	2,942 ± 0,265 (6)	2,957 ± 0,213 (36)	NA	3,087 ± 0,219 (79)	NA	3,087 ± 0,219 (79)	0,0061*
rs2807267	hsa-miR-934-3p {isomiR} 51_72	30,915 ± 0,939 (6)	29,744 ± 4,536 (35)	NA	28,718 ± 5,188 (79)	NA	28,718 ± 5,188 (79)	0,3733
rs2807267	hsa-miR-934-5p {hsa-miR-934} 15_36	35,524 ± 5,200 (6)	32,128 ± 8,079 (35)	NA	32,199 ± 5,417 (79)	NA	32,199 ± 5,417 (79)	0,2771
rs521188	JAK1	NA	15,240 ± 0,382 (2)	NA	15,004 ± 0,372 (119)	NA	15,004 ± 0,372 (119)	0,3222
rs521188	hsa-miR-3671-3p {hsa-miR-3671} 60_81	NA	33,814 ± 2,041 (2)	NA	30,328 ± 5,095 (118)	NA	30,328 ± 5,095 (118)	0,9615
rs78351440	PITPNM2	4,603 ± 0,525 (110)	4,564 ± 0,464 (11)	NA	NA	NA	NA	0,9693
rs78351440	hsa-miR-4304-3p {isomiR} 36_53	10,978 ± 0,971 (109)	10,934 ± 1,086 (11)	NA	NA	NA	NA	0,7410
rs78351440	hsa-miR-4304-5p {hsa-miR-4304} 11_27	10,679 ± 0,884 (109)	10,540 ± 0,691 (11)	NA	NA	NA	NA	0,7112
rs817478	hsa-miR-4423-3p {hsa-miR-4423} 49_69	13,516 ± 1,038 (91)	13,164 ± 0,898 (24)	NA	12,752 ± 0,920 (5)	NA	12,752 ± 0,920 (5)	0,0934
rs817478	hsa-miR-4423-3p {isomiR} 49_68	13,163 ± 0,911 (91)	12,788 ± 0,948 (24)	NA	12,676 ± 0,682 (5)	NA	12,676 ± 0,682 (5)	0,1230
rs817478	hsa-miR-4423-5p {hsa-miR-4423} 13_34	21,987 ± 4,414 (91)	20,457 ± 5,019 (24)	NA	17,561 ± 4,509 (5)	NA	17,561 ± 4,509 (5)	0,0015*
rs817478	hsa-miR-4423-5p {isomiR} 13_33	21,132 ± 3,869 (91)	19,016 ± 4,154 (24)	NA	18,553 ± 5,013 (5)	NA	18,553 ± 5,013 (5)	0,0030*
rs72928038	hsa-miR-4464-3p {isomiR} 62_80	41,435 ± 0,192 (2)	33,582 ± 5,411 (28)	NA	36,751 ± 6,072 (90)	NA	36,751 ± 6,072 (90)	0,7315
rs72928038	hsa-miR-4464-5p {hsa-miR-4464} 12_32	15,763 ± 1,584 (2)	16,077 ± 1,156 (28)	NA	15,818 ± 1,186 (90)	NA	15,818 ± 1,186 (90)	0,7044
rs72928038	hsa-miR-4464-5p {isomiR} 16_36	19,479 ± 4,176 (2)	18,186 ± 4,207 (28)	NA	18,366 ± 3,710 (90)	NA	18,366 ± 3,710 (90)	0,1493
rs12365699	hsa-miR-4492-3p {isomiR} 59_75	6,586 ± 1,208 (69)	6,563 ± 1,206 (40)	NA	7,000 ± 1,118 (11)	NA	7,000 ± 1,118 (11)	0,8659
rs6589706	hsa-miR-4492-3p {isomiR} 59_75	6,294 ± 1,147 (29)	6,813 ± 1,264 (55)	NA	6,576 ± 1,095 (36)	NA	6,576 ± 1,095 (36)	0,5292
rs7926599	hsa-miR-4492-3p {isomiR} 59_75	6,588 ± 1,186 (118)	8,305 ± 0,426 (2)	NA	NA	NA	NA	0,5171

Die Mittelwerte bzw. Tukey-biweight Mittelwerte ± Standardabweichungen (MW ± SD) für die Expression von 22 miRNAs (n = 120 ΔC_T-Werte aus qPCR-Experimenten) und fünf host Genen (n = 121 log2 Signalwerte aus Microarray-Analysen) in B-Zellen aus Blutproben abhängig von den Genotypen von zwölf SNPs sind angegeben. In Klammern ist angegeben, wie viele Proben den entsprechenden Genotyp des jeweiligen SNPs hatten. Lagen in der Studienkohorte keine homozygoten Träger eines Allels vor, ist „NA“ vermerkt. Gemischte lineare Modelle wurden zur Berechnung der p-Werte (Wald χ²-Tests, adjustiert nach Alter, Geschlecht und Gruppenzugehörigkeit) genutzt. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind mit einem * markiert. Die Expression von drei miRNAs und zwei host Genen stellte sich in den vorliegenden Daten als abhängig vom Genotyp der angegebenen SNPs heraus. RA = MS-Risikoallel.

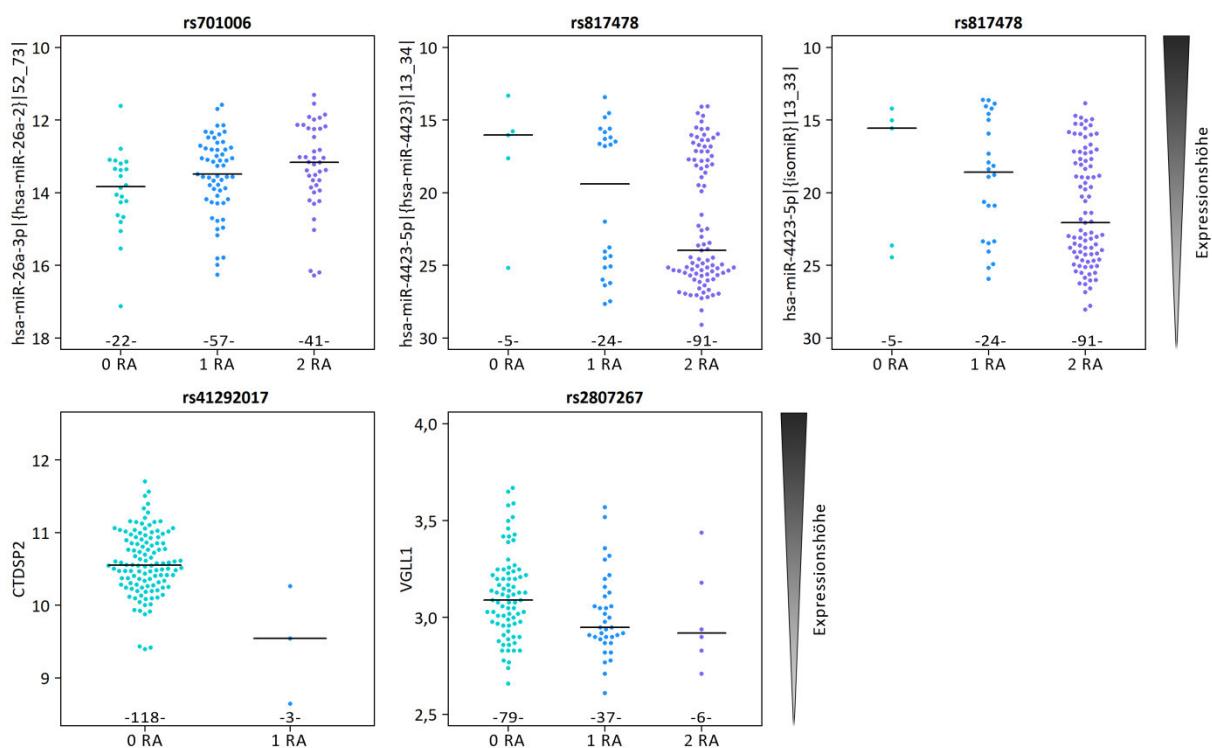


Abbildung 15: eQTL-Analyse für hsa-miR-26a-2-3p, hsa-miR-4423-5p, CTDSP2 und VGLL1. Die B-Zell-Expression der drei miRNAs (ΔC_T -Werte in umgekehrter Darstellung auf der y-Achse) und der CTDSP2- sowie VGLL1-mRNA (log2 Signalintensitäten) ist jeweils abhängig vom Genotyp der angegebenen SNPs in Beeswarm-Plots dargestellt. Die Anzahl der Proben von Studienteilnehmern, die 0, 1 oder 2 Risikoallele (RA) tragen, ist jeweils angegeben. VGLL1 ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und männliche Studienteilnehmer können entweder 0 oder 1 RA tragen. Die Mediane sind als schwarze horizontale Linien eingezeichnet. Für hsa-miR-26a-2-3p geht das RA des MS *lead* SNPs rs701006 mit einer höheren Expression einher. Das RA von rs41292017, nahe des *stem-loops* von hsa-mir-26a-2, ist mit einer geringeren Expression des *host* Gens CTDSP2 assoziiert. Der SNP rs817478 ist in einem CNNC-Motif nahe hsa-mir-4423 lokalisiert und für das RA wurde eine geringere Expression der miRBase-gelisteten Form und der Isomir des reifen -5p-Moleküls beobachtet. Für VGLL1 geht das RA des MS *lead* SNPs rs2807267 mit einer niedrigeren Expression einher. Ein eQTL-Effekt dieses SNPs auf die Expression von hsa-mir-934, in Intron 4 von VGLL1, war in den Daten jedoch nicht zu sehen.

Für VGLL1 wurde bei Trägern des MS-Risikoallels rs2807267T gegenüber den Trägern des G-Allels eine verringerte Genexpression gemessen. VGLL1 wird auf dem X-Chromosom kodiert. Dieses Gen war in den untersuchten B-Zellen mit log2 Signalintensitäten von rund 3,0 generell recht niedrig exprimiert. Es konnte kein deutlicher Einfluss des Genotyps von rs2807267 auf die Expression reifer Moleküle von der in Intron 4 von VGLL1 liegenden hsa-mir-934 ermittelt werden. Bei rs2807267 handelt es sich um einen MS-assoziierten *lead* SNP, welcher in einer Distanz von ca. 33 kb zu hsa-mir-934 lokalisiert ist.

Korrelation von miRNA- und Zielgen-Expression

Durch Korrelationsanalysen wurde untersucht, ob die Expression der priorisierten Zielgene von

hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934 und hsa-mir-4423 in den B-Zell-Proben in einem negativen Zusammenhang mit der Expression der jeweiligen miRNAs steht. Die Analyse der Expression der zehn Zielgene von hsa-mir-934 und des einen Zielgens (TMEM47) von hsa-mir-4423 ergab keine signifikanten Zusammenhänge mit der Expression der reifen miRNA-Moleküle. Von den 60 priorisierten Zielgenen von hsa-mir-199a-1 konnte für acht ein signifikant negativer Zusammenhang ihrer Expression mit der Expression der reifen 3p- oder 5p-miRNA-Moleküle gezeigt werden (s. Tabelle 15). Für die Zielgene AMZ2, CSNK1G2, HTRA2, MTG2, NT5C und PRMT1 bestand mit allen vier hsa-mir-199a-1-Varianten (miRBase-gelistet und IsomiRs) eine signifikante Korrelation.

Tabelle 15: Negative Korrelation der Expressionswerte von hsa-mir-199a-1 und ihren Zielgenen

Zielgen	Transcript cluster ID	hsa-miR-199a-3p				hsa-miR-199a-5p			
		miRBase-Form		IsomiR		miRBase-Form		IsomiR	
		p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β
AMZ2	TC1700008734.hg.1	0,0007**	-0,0079	0,0009**	-0,0133	0,0032**	-3,4225	0,0029**	-0,0714
CSNK1G2	TC1900006565.hg.1	0,0002**	-0,0137	0,0011**	-0,0210	0,0003**	-6,5994	0,0023**	-0,1165
DYRK1B	TSUnmapped00000019.hg.1	0,0075**	-0,0091	0,0078**	-0,0155	0,0222	-3,7845	0,0215	-0,0799
HTRA2	TC0200008090.hg.1	0,0002**	-0,0172	0,0012**	-0,0260	0,0010**	-7,5860	0,0027**	-0,1428
MTG2	TC2000007994.hg.1	0,0039**	-0,0077	0,0084**	-0,0120	0,0012**	-4,1615	0,0080**	-0,0717
NT5C	TC1700011736.hg.1	7,4e-05**	-0,0175	0,0004**	-0,0269	0,0002**	-8,2324	0,0009**	-0,1512
OFGOD3	TC1700012120.hg.1	0,0462	-0,0036	0,0703	-0,0056	0,0053**	-2,4363	0,0790	-0,0324
PRMT1	TC1900011781.hg.1	9,4e-05**	-0,0142	0,0001**	-0,0243	4,3e-05**	-7,0949	0,0001**	-0,1426

Die priorisierten Zielgene von hsa-mir-199a-1, für deren Expression eine signifikante negative Korrelation mit den Leveln von mindestens einem reifen miRNA-Molekül (Wald χ^2 -Test $p < 0,01$ und negativer β -Koeffizient) bestand, sind aufgelistet. Die Clariom D-Array transcript cluster IDs der Zielgene sind angegeben. Sowohl p-Werte als auch β -Koeffizienten wurden mit gemischten linearen Modellen (adjustiert nach Alter, Geschlecht und Gruppenzugehörigkeit) berechnet. Signifikante p-Werte ($p < 0,01$) sind mit ** markiert.

5.10 ZUSAMMENFÜHRUNG DER ERGEBNISSE AUS DEN UNTERSUCHUNGEN *IN VITRO* UND *IN VIVO*

Die Kombination der Ergebnisse der Untersuchungen in MS-Patienten und gesunden Kontrollen mit denen aus den Zellkulturexperimenten erlaubt es, Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen, die Genotyp-Phänotyp-Assoziationen im Menschen bedingen, zu ziehen. Für sechs miRNAs wurden Einflüsse der Genotypen von MS-assozierten SNPs, die in den miRNA-kodierenden Bereichen lokalisiert sind, auf die Prozessierungsrate von Microprocessor gezeigt. Von diesen sechs miRNAs war eine miRNA nicht per qPCR-Analyse messbar (hsa-mir-3661) und eine miRNA war nur sehr schwach in B-Zellen exprimiert (hsa-mir-934). Die anderen vier miRNAs waren in allen 120 Proben per qPCR-Messung detektierbar und zwischen den Studiengruppen differentiell exprimiert. Zu zwei dieser miRNAs (hsa-mir-4304 und hsa-mir-4464) lagen die MIR SNPs nur in einer Allelausprägung in der

Studienkohorte vor, sodass für diese beiden miRNAs keine eQTL-Analysen möglich waren. Für die MIR SNPs nahe der hsa-mir-199a-1- und hsa-mir-4423-kodierenden Sequenzen lagen in der Studienkohorte beide Allele vor.

Tabelle 16: Integrative Zusammenfassung der Hauptergebnisse dieser Arbeit

microRNA	Prozessierungs-analyse	SNP-MS-Assoziation (OR > 2,0)	Differentielle Expression der microRNA (Gruppe)	eQTL microRNA	eQTL host Gen
hsa-mir-26a-2			✗	✗	✗
hsa-mir-199a-1	✗		✗		
hsa-mir-548ac		✗			
hsa-mir-934	✗	✗			✗
hsa-mir-3661	✗				
hsa-mir-3671					
hsa-mir-4252					
hsa-mir-4304	✗		✗		
hsa-mir-4423	✗		✗	✗	
hsa-mir-4464	✗		✗		
hsa-mir-4492			✗		

Elf miRNAs wurden im Rahmen der vorliegenden Studie in Zellkultur und in Blutproben von MS-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht. Im Rahmen der Prozessierungsanalyse wurde für sechs miRNAs ein Effekt von SNPs, die in den genomischen Bereichen der miRNA liegen, auf die Spaltungsrate durch Microprocessor gezeigt. In der Studienkohorte aus $n = 63$ MS-Patienten und $n = 28$ gesunden Kontrollen (H) wurden für die MS-assoziierten Allele von zwei SNPs Odds Ratios (OR) > 2,0 berechnet. Für reife miRNAs und IsomiRs aus sechs miRNA-kodierenden Loci wurde eine differentielle Expression in B-Zellen aus 120 Probanden festgestellt. Für die Expression von zwei miRNAs bzw. zwei miRNA host Genen und naheliegende MS-assoziierte SNPs wurden eQTL-Effekte gezeigt. Für hsa-mir-3661 und hsa-mir-4252 konnten keine Expressionsdaten analysiert werden, da die Assays zur Quantifizierung der reifen Moleküle die Qualitätskontrolle nicht bestanden haben, und sechs miRNAs liegen nicht in Protein-kodierenden Genloci (durchgestrichen). eQTL = *expression quantitative trait locus*.

Der MIR SNP rs1005039 von hsa-mir-199a-1 hatte eine MAF von 2 % und für diesen SNP ergab sich kein signifikanter eQTL-Effekt ($p > 0,05$). In HeLa-Zellen und in B-Zellen zeigte sich, dass das selteneren MS-assoziierte T-Allel von rs1005039, welches in einem CNNC-Motiv liegt, mit einer höheren miRNA-Expression assoziiert ist (s. Abbildung 8 und Tabelle 14). Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit 60 Zielgene von hsa-mir-199a-1 bestimmt. Der MIR SNP rs817478 von hsa-mir-4423 hatte in der Studienkohorte eine MAF von 15 % und für diesen SNP wurde ein signifikanter eQTL-Effekt gezeigt. *In vitro* und *in vivo* ging das MS-Risikoallel rs817478A mit niedrigen Leveln der reifen miRNA-Moleküle einher. Das Vorliegen des häufigeren A-Allels gegenüber dem des selteneren Allels bedeutet, dass kein CNNC-Motiv in der flankierenden Region des miRNA *stem-loops* besteht. Für hsa-mir-4423 wurde mit TMEM47 ein Zielgen bestimmt, das laut der *in silico*-Analyse mit dem Webtool RNAhybrid mit der miRNA hybridisiert und das auch durch die Datenbank miRWalk 3.0 vorhergesagt wird. Zusätzlich

ERGEBNISSE

wurde auch zu hsa-mir-26a-2 und den rund 112 kb entfernten SNP rs701006 ein eQTL-Effekt gezeigt. Für das *host* Gen von hsa-mir-26a-2, CTDSP2, wurde ein eQTL-Effekt mit dem MIR SNP rs41292017 gezeigt.

6. DISKUSSION

In der jüngsten GWAS-Studie zu MS wurden 233 MS-assoziierte genetische Varianten identifiziert [36]. MiRNAs können die molekularen Mechanismen, welche solchen Assoziationen mit Erkrankungen zugrunde liegen, vermitteln und die Erforschung ihrer Rolle bei Erkrankungen kann Auswirkungen auf die Entdeckung von Biomarkern und auf die Entwicklung von miRNA-basierten Therapieansätzen haben [73]. In der vorliegenden Studie wurden genetisch mit MS assoziierte miRNAs identifiziert und damit verbundene molekulare Prozesse untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Abbildung 16 zusammengefasst und werden im Folgenden diskutiert.

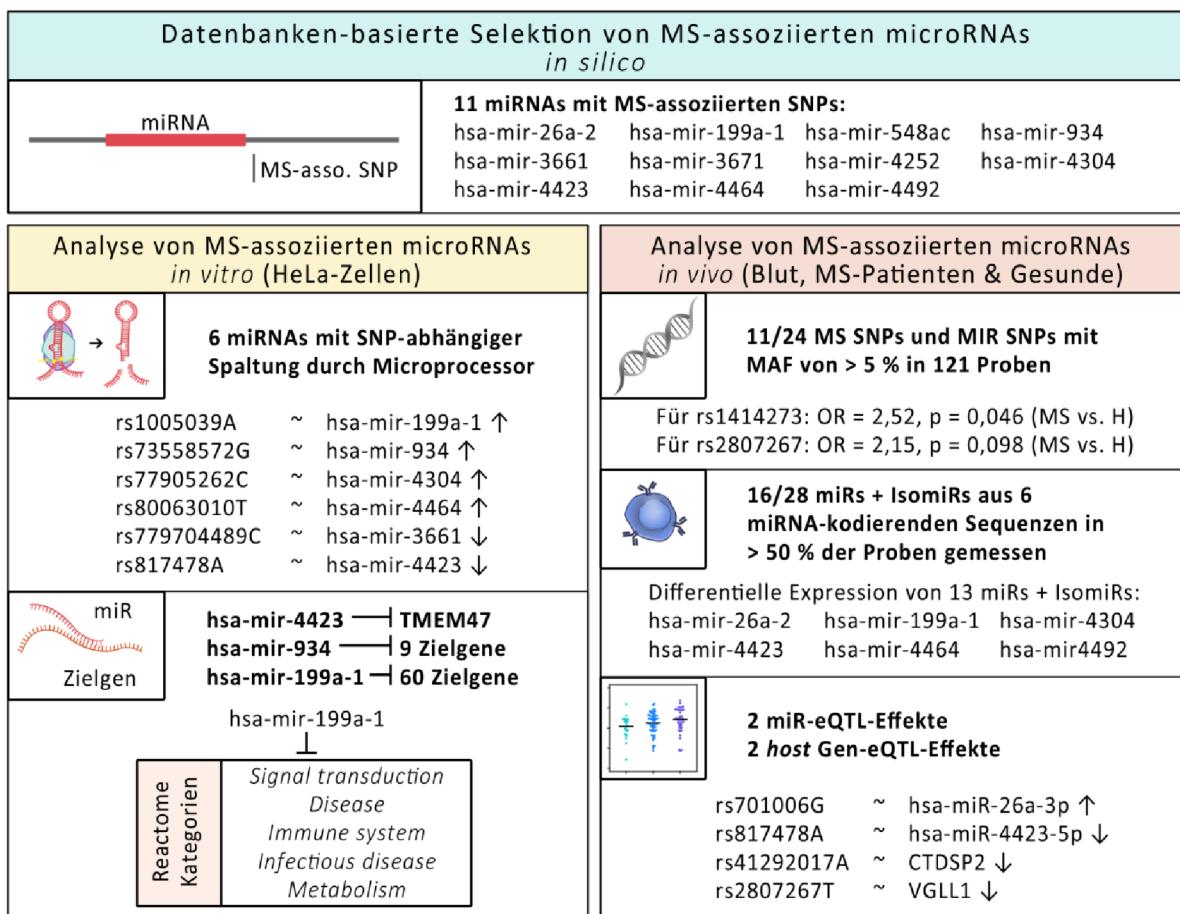


Abbildung 16: Darstellung der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit. Elf miRNAs, die in genetischen Regionen, die mit einem erhöhten Risiko an MS zu erkranken assoziiert sind, lokalisiert sind und die daher eine kausale Rolle bei MS spielen könnten, wurden über einen Datenbanken-basierten Ansatz ausgewählt. Sie wurden *in silico*, *in vitro* und *in vivo* untersucht. Für sechs miRNAs konnte gezeigt werden, dass die Allele von SNPs im Bereich der miRNA-kodierenden Sequenzen die Prozessierung der miRNAs beeinflussen. Für drei miRNAs wurden Zielgene priorisiert, die unter anderem an immunologischen Prozessen beteiligt sind. In n = 121 B-Zell-Proben wurden 24 ausgewählte MS-assoziierte genetische Varianten genotypisiert. Die Expression der miRNAs und ausgewählter Isoformen wurde in n = 63 MS-Patienten mit verschiedenen Verlaufsformen und n = 28 gesunden Kontrollen untersucht. Für die Expression von hsa-miR-26a-3p, hsa-miR-4423-5p, CTDSP2 und VGLL1 wurde eine Assoziation mit den MS-Risikoallelen gezeigt.

Diese Studie ist die erste, in der untersucht wurde, wie sich die Genotypen der ausgewählten SNPs auf die Spaltung der miRNA-Vorläufer durch Microprocessor auswirken. Für hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934, hsa-mir-3661, hsa-mir-4304, hsa-mir-4423 und hsa-mir-4464 konnte gezeigt werden, dass die Allele von SNPs im Bereich der miRNA-kodierenden Sequenzen die Prozessierung der miRNAs beeinflussen. Für hsa-mir-199a-1 und hsa-mir-934 wurden Zielgene priorisiert, die unter anderem an immunologischen Prozessen beteiligt sind. Die Expression der miRNAs und ausgewählter Isoformen wurde in $n = 120$ B-Zell-Proben von $n = 63$ MS-Patienten mit verschiedenen Verlaufsformen und $n = 28$ gesunden Kontrollen untersucht. Bis auf hsa-mir-26a-2 und hsa-mir-199a-1 wurden die miRNAs bislang nur vereinzelt in der Literatur beschrieben und in der vorliegenden Studie erstmals explizit in B-Zellen von MS-Patienten gemessen. Für 13 reife miRNAs und IsomiRs aus sechs miRNA-kodierenden Loci wurde eine differentielle Expression zwischen den Studienkohorten gezeigt. Außerdem konnte für die Expression von hsa-miR-26a-2-3p und hsa-miR-4423-5p eine Assoziation mit den MS-Risikoallelen gezeigt werden. Die Analysen verbessern das Verständnis dieser speziellen miRNAs und ihrer Isoformen bei MS und zeigen allgemeine Herausforderungen bei der Aufklärung der genetischen Basis von komplexen immunvermittelten neurologischen Erkrankungen auf.

Nachfolgend wird zunächst diskutiert, was zu Beginn dieser Arbeit für die elf MS-assoziierten miRNAs bekannt war. In Kapitel 6.2 wird näher auf den Einfluss von genetischen Varianten auf die miRNA-Prozessierung sowie die Funktionen der miRNAs eingegangen. Daraufhin werden die Expression reifer miRNAs und IsomiRs im Menschen und beobachtete eQTL-Effekte diskutiert, bevor mit Kapitel 6.4 ein Ausblick auf die Nutzung von miRNAs als Biomarker und in der Therapie erfolgt.

6.1 IDENTIFIZIERUNG VON GENETISCH MIT MS-ASSOZIIERTEN MICRORNAs

Über 200 *lead* SNPs wurden in GWAS mit einem erhöhten Risiko an MS zu erkranken assoziiert [36]. Eine große Herausforderung für die Aufklärung des genetischen Risikos komplexer Erkrankungen ist es, die kausalen Varianten aufzudecken [34]. Das humane Genom ist in Haplotyp-Blöcken, welche sich durch hohe LDs der darin liegenden SNPs auszeichnen, strukturiert. Für die meisten Haplotyp-Blöcke wurde in 2003 eine Länge von 5 – 20 kb beschrieben [178]. Die Höhe der LD-Maße D' und r^2 für ein SNP-Paar korreliert negativ mit der genetischen Distanz zwischen den zwei SNPs. Für gut 30 % bzw. 15 % der SNP-Paare, die 50 kb bzw. 250 kb voneinander entfernt liegen, wurden bei kauasischer Abstammung D' -Werte von 1,0 beschrieben [179]. In der vorliegenden Studie wurden miRNAs, die mit MS *lead* SNPs in einer Distanz von bis zu 250 kb in einem Haplotyp-Block liegen und für die Polymorphismen bekannt sind, welche drei Kriterien erfüllen, genauer untersucht. Die MIR SNPs mussten MAFs von > 1 % haben, in den *stem-loops* oder den flankierenden Regionen der miRNA-kodierenden Sequenzen liegen und sich in LD mit dem MS *lead* SNP befinden. Zehn der elf

identifizierten miRNAs liegen in einer Distanz von bis zu rund 130 kb zu einem MS *lead* SNP und nur hsa-mir-199a-1 liegt knapp 250 kb entfernt.

Um von einer Assoziation zu einem Verständnis der Kausalität der MS-Pathogenese zu gelangen, ist es essentiell, die Auswirkungen genetischer Varianten zu analysieren und somit molekulare Mechanismen aufzuklären, die zu einer Krankheit beitragen. Bei komplexen Erkrankungen tragen häufig nicht-Protein-kodierende Loci mit weitgehend uncharakterisierten regulatorischen Funktionen mutmaßlich kausale Rollen [34]. So wurden für 183 SNPs, die mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind, *cis*-eQTL-Effekte identifiziert; 14 % der SNPs waren mit der Expression von nicht-kodierenden Genen assoziiert [180]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich SNPs in den miRNA-kodierenden Regionen auf die miRNA-Spaltung durch Microprocessor und somit auf die Expressionslevel der reifen miRNA-Moleküle auswirken. Wirken die SNPs als *cis*-miR-eQTL, könnte das einen kausalen Beitrag zu MS bedeuten. Für die Biogenese stellt die Spaltung der pri-miRNA in die pre-miRNA durch Microprocessor den wichtigsten Schritt dar [87, 181]. Für die Effizienz der Prozessierung von miRNAs durch diesen Enzymkomplex werden insbesondere Sequenzmotive in den *stem-loops* und in den nahen ungepaarten flankierenden Regionen der pri-miRNAs als relevant erachtet [182] (s. Kapitel 1.2).

Für sieben der 13 MIR SNPs, die in der vorliegenden Studie für die genauere Untersuchung ausgewählt wurden, fanden sich zum 12. März 2021 im GTEx-Portal (gtexportal.org), der Haupt-Datenbank für humane eQTL und sQTL, Einträge zu eQTL-Effekten mit mRNAs: rs41292017, rs1414273, rs2003071, rs78351440, rs77905262, rs817478 und rs7926599 [34]. Das GTEx-Portal zeigt basierend auf einem Datensatz zu knapp 1000 Individuen und 54 Geweben/Zelllinien die Bedeutung der Untersuchung von Assoziationen zwischen Genotypen und Expressionsdaten auf. Jedoch bestehen folgende Limitationen: Speziell für reife miRNAs liegen in GTEx keine Expressionsdaten vor. Auch B-Zellen sind in GTEx nicht vertreten und sehr seltene Allele sind nicht erfasst. Für die zwei *host* Gene CD58 und PTPNM2 der miRNAs hsa-mir-548ac bzw. hsa-mir-4304 sind jedoch bereits eQTL-Effekte mit den untersuchten MIR SNPs im GTEx-Portal erfasst: Nach Informationen der Datenbank geht das T-Allel von rs1414273 im Mukosagewebe aus dem Ösophagus mit einer verringerten Expression von CD58 und in EBV-transformierten Lymphozyten einer erhöhten CD58-Expression einher. Zu Fibroblasten ist eine verringerte Expression von PTPNM2 für das C-Allel von rs77905262 verzeichnet [34].

Die Identifizierung der Gewebe und Zelltypen, in denen eQTL-Effekte beobachtet werden können, ist relevant für die Beschreibung solcher molekularer Mechanismen [34]. Im miRNA Atlas vom FANTOM5-Projekt sind *deep sequencing* Expressionsdaten zu verschiedenen Geweben und Zelltypen einsehbar [183]. Im Vergleich zu anderen miRNA-Expressionsdatenbanken enthält dieser Atlas genauere

Informationen auch zu neu identifizierten und niedrig exprimierten miRNAs. Laut dieser Daten ist hsa-miR-26a-5p in Leukozyten mit rund 60.000 – 120.000 *counts per million* (cpm) besonders hoch exprimiert. Für hsa-miR-199a-3p wurden in Lymphozyten Expressionslevel von bis zu ca. 100 cpm gemessen. Die Datenlage im miRNA Atlas ist für die weiteren in der vorliegenden Studie untersuchten reifen miRNAs spärlich, ihre Expression in B-Zellen ist mutmaßlich sehr niedrig.

In der Fachliteratur wurden die Expression und die Funktionen von hsa-mir-26a-2 und hsa-mir-199a-1 bereits umfangreicher beschrieben, als für die anderen in der vorliegenden Studie untersuchten miRNAs. Dies spiegelt sich auch in der Datenbank miRTarBase (Version 8) [118] wider. Nur für die reifen miRNAs von hsa-mir-26a-2 und hsa-mir-199a-1 sind dort Zielgene, die bereits mit Luciferase-Reporter-Assays validiert wurden, hinterlegt. Für hsa-miR-26a-5p sind 66 validierte Zielgene gelistet [118]. Hsa-mir-26a-2 gehört zur mir-26-Familie (miRBase: MIPF0000043 [81]), die in Wirbeltieren konserviert ist und zu der beim Menschen auch hsa-mir-26a-1 und hsa-mir-26b zählen. Die *seed*-Sequenz der reifen -5p Moleküle ist für alle drei miRNA-Vorläufer identisch und somit decken sich die Zielgene der reifen miRNAs weitestgehend. Für diese Familie ist bereits eine Rolle bei verschiedenen Krebserkrankungen beschrieben worden; unter anderem durch die Herunterregulation des Tumorsuppressors PTEN, von Cyclin CCND1 und BCL2 [184]. Außerdem wurde hsa-mir-26a als Regulator der Angiogenese, des Wachstums von Endothelzellen und der Osteogenese beschrieben [184].

Für hsa-miR-199a-3p und -5p waren zu Beginn der Studie in der Datenbank miRTarBase [118] 80 validierte Zielgene verzeichnet. Hsa-mir-199a-1 gehört gemeinsam mit hsa-mir-199a-2 und hsa-mir-199b einer miRNA-Familie (miRBase: MIPF0000040 [81]) an, die evolutionär hochkonserviert ist. Für die reifen miRNAs wurde eine Beteiligung an der Regulation diverser physiologischer und pathologischer Prozesse beschrieben: an der Zell-Proliferation und -Migration, an der Apoptose, Autophagie und am Zucker-Stoffwechsel [185]. Weiterhin wurde für die 3p-Form dieser miRNA kontextabhängig sowohl eine Funktion als Tumorsuppressor als auch als Oncogen gezeigt [186].

Hsa-miR-548ac-3p wurde erstmals in humanen B-Zellen identifiziert [187]. Laut dieser Studie wird die miRNA hauptsächlich in Lymphom-Zelllinien, EBV-transformierten B-Zellen und *memory* B-Zellen exprimiert. Die besonders hohe Expression dieser miRNA in EBV-transformierten B-Zellen weist auf eine Rolle dieser miRNA in pathologischen EBV-vermittelten Prozessen hin. Diese miRNA gehört zur Primaten-spezifischen mir-548-Familie (miRBase: MIPF0000317 [81]), die vom Made1-Transposon abstammt [188]. Diese miRNA reguliert Zielgene, welche unter anderem an Entzündungsprozessen beteiligt sind. SDC4, SEL1L und TNFAIP3 wurden als Zielgene von hsa-mir-548ac validiert [86].

Bei hsa-mir-934 handelt es sich ebenfalls um eine Primaten-spezifische miRNA [81]. In Luciferase-Assays wurden BCAT1 [189], BRMS1L [190], PROX1 [191], PTEN [192] und UBE2N [193] als Zielgene

von hsa-mir-934 identifiziert. BCAT ist eine Transaminase [189], BRMS1L [190] und UBE2N [193] wirken als transkriptionelle Repressoren und bei PROX1 handelt es sich um einen an der Neurogenese beteiligten Transkriptionsfaktor [191]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass hsa-mir-934 die Differenzierung von Progenitorzellen zu Neuroblasten fördert, unter anderem durch die direkte Herunterregulierung von FZD5, TFCP2L1 und RAB3B [194].

Hsa-mir-3661 ist nur in Menschen und Borneo-Orang-Utans konserviert [81]. PPP2CA, welches im gleichen Genlocus wie hsa-mir-3661, jedoch auf dem anderen DNA-Strang, kodiert wird und welches für eine Untereinheit der Phosphatase PP2A kodiert, wurde als Zielgen der miRNA beschrieben [195]. Eine erhöhte Expression von hsa-mir-3661 wurde während der Reifung von Erythrozyten gemessen [196]. Außerdem wurden Vorläufer-Moleküle in extrazellulären Vesikeln von einer Coloncarcinom-Zelllinie [197] beschrieben. Eine verringerte Expression wurde hingegen in Biopsien einer Brustkrebsvorstufe (duktales Karzinom *in situ*) gemessen [198].

Über hsa-mir-3671, hsa-mir-4252 und hsa-mir-4304 ist bislang wenig bekannt. In miRBase sind alle drei miRNAs nur für den Menschen gelistet [81]. Eine differentielle Expression von hsa-mir-3671 wurde im peripheren Blut im Kontext des Myokardinfarkts [199], in Hautbiopsien von Psoriasis-Patienten [200], in primär kultivierten, differenzierten Keratinozyten [201] und in Speichelproben in Folge von Langstreckenläufen [202] beschrieben. TGFB2 stellt bislang das einzige für diese miRNA identifizierte Zielgen dar [203]. Eine differentielle Expression von hsa-mir-4252 wurde bislang in Biopsien aus dem Endometrium [204], in Brustkrebs-Biopsien [205] und in VEGF-C-transformierten Magenkrebs-Zelllinien (Bezeichnungen: MKN-45, SGC-7901) [206] beschrieben. Genetische Varianten nahe der hsa-mir-4304-kodierenden Sequenz sind mit Schizophrenie [207, 208] und intellektueller Behinderung [209] assoziiert. Darüber hinaus wurden die Funktionen dieser miRNAs bislang noch nicht aufgeklärt.

Wie hsa-miR-548ac-3p wurden auch reife miRNAs aus den Genloci von hsa-mir-4423, hsa-mir-4464 und hsa-mir-4492 erstmals in humanen B-Zellen identifiziert [187]. Nur für hsa-mir-4423 ist die miRNA neben dem Menschen auch in einer anderen Spezies, in diesem Fall dem Schimpansen, gelistet [81]. Hsa-mir-4423 wurde als Regulator der Differenzierung des Epithels in den Atemwegen beschrieben [210]. Weitere experimentelle Daten zur Funktion dieser miRNA und von hsa-mir-4464 und hsa-mir-4492 wurden in der Literatur bisher nicht gefunden.

6.2 VON DER GENETISCHEN ASSOZIATION VON MICRORNAs ZU KAUSALEN PATHOMECHANISMEN BEI MS

In der vorliegenden Arbeit wurde einem potentiell kausalen Mechanismus, über den SNPs in den MS-assoziierten miRNA-kodierenden Sequenzen die Biogenese der reifen miRNA-Moleküle

beeinflussen können, nachgegangen. Die experimentelle Untersuchung in HeLa-Zellen mit einem Luciferase-basierten System war speziell für die Aufdeckung von Unterschieden in der Effizienz der Microprocessor-abhängigen Spaltung ausgerichtet. Die Untersuchung in Zellkultur birgt gegenüber *in vivo*-Methoden den Vorteil kontrollierter Bedingungen, da sich die untersuchten Proben nur in einem SNP unterscheiden. Von Vorteil ist bei den genutzten Luciferase-Vorläufer-miRNA-Konstrukten mit dem SV40-Promotor die Sicherstellung der Polymerase II-abhängigen Transkription des Hybridgens [211]. Die Untersuchung in HeLa-Zellen hat gegenüber zellfreien Methoden, die auf der Inkubation von miRNA-Vorläufertranskripten mit Zelllysaten oder Immunpräzipitaten basieren, den Vorteil, dass sowohl Drosha als auch DGCR8, als Teil von Microprocessor, sowie weitere an der Prozessierung beteiligte RNA-bindende Proteine endogen exprimiert vorliegen [153, 154]. Eine absolute Quantifizierung von prozessierten versus nicht-prozessierten miRNA-Molekülen, wie bei Assays, die auf der Nutzung und dem Nachweis radioaktiver Isotope beruhen [212], ist mittels Luciferase-Assays jedoch nicht möglich.

Für sechs der in der vorliegenden Studie untersuchten MIR SNPs konnte ein Einfluss auf die Effizienz der Spaltung der pri-miRNAs durch Microprocessor robust für verschiedene experimentelle Bedingungen (Konzentration/Zeit) gezeigt werden. Die Analyse ergab, dass das MS-assoziierte A-Allel von rs1005039 gegenüber dem G-Allel in der pri-miRNA-Sequenz von hsa-mir-199a-1 zu einer höheren Prozessierungsrate führt. Dieser SNP liegt in einem CNNC-Motiv an Stelle des ersten Ns. Die Variante rs817478 an Position 3'(+18) in hsa-mir-4423 liegt ebenfalls in einem CNNC-Motiv. Das seltener, in Bezug auf MS protektive C-Allel führt dabei zur Bildung des CNNC-Motivs und geht nach den in der vorliegenden Studie erhobenen Daten mit einer erhöhten Spaltrate einher. Auf *in vivo* beobachtete eQTL-Effekte für hsa-mir-4423 wird in Kapitel 6.3 näher eingegangen. Der SNP rs73558572 ist im basalen *stem* von hsa-mir-934 lokalisiert. Das seltener A-Allel führt zu einem Mismatch in diesem Bereich und geht im Vergleich zum MS-assoziierten G-Allel mit einer weniger effizienten Prozessierung der pri-miRNA einher. Hsa-mir-934 wird auf dem X-Chromosom kodiert, was für eine mögliche Rolle dieser miRNA bei der MS, die häufiger bei Frauen als bei Männern auftritt [4], von besonderem Interesse ist. Für das CNNC-Motiv wurde bereits zuvor bei verschiedenen miRNAs beschrieben, dass es durch die RNA-bindenden Proteine SRSF3 [108] und DDX17 [111] erkannt werden und zu einer erhöhten Prozessierungseffizienz führen kann. Es wurde eine Präferenz für dieses Motiv 16 – 21 nt downstream der Microprocessor-Spaltstelle des 3p-Strangs beschrieben [108]. Fang und Bartel haben 2015 beschrieben, dass es für eine effiziente Spaltung günstig ist, wenn der *stem*, bis auf ein mögliches GHG-Motiv, perfekt gematched ist [103]. Für die Plausibilität der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spricht also, dass drei dieser SNPs in Sequenzmotiven und Strukturen liegen, für die in verschiedenen Publikationen der letzten Jahre beschrieben wurde, dass sie die Erkennung von pri-miRNAs durch

Microprocessor beeinflussen können [103, 107–109, 181] (s. Kapitel 1.2).

Das MS-assozierte C-Allel von rs779704489 in hsa-mir-3661 ging mit einer verringerten Prozessierungseffizienz einher. Der SNP liegt im flankierenden 3' Sequenzabschnitt der miRNA, jedoch in keinem bisher bekannten Sequenzmotiv, das die miRNA-Prozessierung beeinflusst. Der SNP rs77905262 in hsa-mir-4304 bestimmt die Base an Position 5'(-15) im flankierenden Bereich der pri-miRNA. Das MS-assozierte C-Allel ging in der vorliegenden Studie mit einer erhöhten Spaltungsrate durch Microprocessor einher. Die Base selbst liegt nicht in einem bereits beschriebenen Sequenzmotiv, jedoch mit einer Base Abstand upstream von einem UG-Motiv. Für das UG-Motiv im 5' flankierenden Strang nahe des doppelsträngigen *stems* wurde gezeigt, dass es mit Drosha interagiert und eine positive Auswirkung auf die Spaltung der pri-miRNA durch Microprocessor hat [108]. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen somit nahe, dass auch umliegende Basen einen Einfluss auf die Interaktion mit Drosha haben können. Für rs80063010 in der hsa-mir-4464-kodierenden Sequenz konnte ebenfalls ein Einfluss auf die Prozessierungs-effizienz gezeigt werden. Dieser SNP ist an Position 5'(-56) lokalisiert und liegt damit weiter vom pri-miRNA *stem-loop* entfernt als die anderen in der vorliegenden Studie untersuchten SNPs. Für das MS-assozierte T-Allel konnte gegenüber dem G-Allel eine höhere Prozessierungsrate gezeigt werden. Weitere Forschung ist nötig, um herauszufinden, was für Sequenzmotive und RNA-bindende Proteine bei diesen drei miRNAs tatsächlich eine Rolle spielen.

Für drei SNPs konnte in der vorliegenden Studie kein Einfluss auf die Spaltung durch Microprocessor gezeigt werden, obwohl einer, rs41292017 in hsa-mir-26a-2, an mehreren CNNC-Motiven beteiligt ist und die zwei anderen, rs1414273 in hsa-mir-548ac und rs521188 in hsa-mir-3671, über das Vorliegen einer Watson-Crick-Basenpaarung im basalen *stem* entscheiden. Der SNP in hsa-mir-26a-2 liegt in einer GC-reichen Region, in der sich vier CNNC-Motive überlappen. Im Falle des SNPs rs1414273 liegt je nach Allelausprägung entweder ein Watson-Crick- (A-U) oder ein Wobble-Basenpaar (G-U) vor. Für die Struktur der pri-miRNA von hsa-mir-3671 wird in miRBase [81] und miRCarta [150] eine acht Basenpaare lange ungepaarte Region im oberen *stem* postuliert. Möglicherweise sind dies besondere Fälle, bei denen die SNP-Genotypen keinen Einfluss auf die Effizienz von Microprocessor haben. Für die Erkennung durch Microprocesscor ist ein ca. 35 nt langer *stem* optimal [103]. Microprocessor richtet sich anhand der Haarnadel-Struktur und anhand von Sequenzmotiven aus [106, 110] und für den oberen *stem* wurde eine Tendenz für *bulge*-depletierte Regionen beschrieben [103]. Kürzere oder längere *stems* können dazu führen, dass die Spaltung durch Microprocessor inakkurat oder an alternativen Stellen erfolgt [110]. Die vorhergesagte Struktur von hsa-mir-3671 könnte darauf hinweisen, dass es sich um eine nicht-kanonisch prozessierte miRNA handelt. Auch für die Sekundärstrukturen von hsa-mir-3661, hsa-mir-4252 und hsa-mir-4492 werden in miRBase viele teils über mehrere nt verlaufende *bulges* vorhergesagt [81].

Durch die Zellkulturanalysen der vorliegenden Studie wurde kausalen molekularen Mechanismen, die möglichen eQTL-Effekten *in vivo* zugrunde liegen, untersucht. Für eQTLs wurden zelltypspezifische Effekte beschrieben [213]. Daher könnte die Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen in anderen, z.B. neuronalen Zelllinien weitere Erkenntnisse erbringen. Neben den in der vorliegenden Studie untersuchten SNPs können auch andere genetische Varianten, wie SNPs mit niedrigeren MAFs oder SNPs in größerem Abstand zum *stem-loop*, die Biogenese und Funktion von miRNAs beeinflussen und darüber kausal zum genetischen Risiko an MS zu erkranken beitragen. Die miRNA-Biogenese beginnt mit der Transkription der pri-miRNA durch Polymerase II. Wie bei hsa-mir-26a-2 und dem *host* Gen CTDSP2 kann so eine pri-miRNA zunächst als Teil eines anderen Transkripts entstehen. Der Einfluss von SNPs im Promoterbereich auf die Transkription von pri-miRNAs wurde in dieser Arbeit nicht erforscht. Weitere Enzyme wie Dicer, Transporter wie Exportin-5 und andere RNA-bindende Kofaktoren tragen ebenfalls zur miRNA- und lsomiR-Biogenese bei [87, 88]; alles potentielle Mechanismen über die genetische Varianten die miRNA-Biogenese beeinflussen könnten. Weiterhin sind verschiedene nicht-kanonische miRNA-Biogenesewege bekannt, für die wiederum andere Faktoren, wie das Spleißosom bei Mirtrons, eine Rolle spielen [73]. Für drei miRNAs, die in der vorliegenden Studie nicht genauer untersucht wurden, weil es sich bei ihnen vermutlich um Microprocessor-unabhängige Mirtrons handelt, sind ebenfalls SNPs, die in LD mit MS-assozierten Varianten sind, bekannt: hsa-mir-6759, hsa-mir-6871 und hsa-mir-6891 (s. Tabelle S 14). Letztere miRNA liegt nur 200 bp entfernt von einer MS-assozierten Variante in HLA-B. Die Aufklärung von solchen soeben beschriebenen Drosha/Microprocessor-unabhängigen Mechanismen ist für weitere Untersuchungen von miRNAs bei MS von Interesse.

Um die Auswirkungen einer erhöhten oder verringerten Bildung reifer miRNAs zu verstehen, ist es essentiell, die spezifische Funktion der reifen miRNA-Moleküle aufzuklären. Für hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934 und hsa-mir-4423 wurden deshalb in der vorliegenden Studie Zielgene bestimmt. Die miRNAs wurden in HeLa-Zellen überexprimiert und mittels Transkriptomanalysen wurden potentielle Zielgene identifiziert und Datenbanken-basiert und *in silico* geprüft. Die Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmiden, welche pri-miRNAs kodieren, birgt den Vorteil, dass die Schritte der miRNA-Biogenese durchlaufen werden müssen, bevor reife miRNAs entstehen. Somit ist diese Methode natürlichen Prozessen in HeLa-Zellen ähnlicher als eine Transfektion mit miRNA mimics, welche an den Enden modifiziert sind, nach Transfektion zunächst nicht an AGO2 gebunden sind, nur eine spezielle Sequenz repräsentieren und die Abundanz reifer miRNA-Moleküle schlagartig erhöhen [214].

Die durchgeführten Microarray-Analysen ermöglichen die Identifizierung von herunterregulierten Zielgenen im gesamten bekannten humanen Transkriptom. Einschränkend können Zielgene, die in HeLa-Zellen nicht exprimiert werden, darunter z.B. virale Transkripte, sowie Interaktionen, die zur

Inhibition der Translation führen, ohne die Transkriptlevel stark zu beeinflussen, nicht auf diesem Wege identifiziert werden. Über den Profiling-Ansatz werden keine direkten miRNA-Zielgen-Interaktionen nachgewiesen, sodass ein Teil der beobachteten Effekte auf Sekundäreffekten beruhen kann [215]. Der in der vorliegenden Studie geforderte $fc < -1,5$ bedeutet eine Herunterregulation um > 33 % und stellt bereits einen deutlichen regulatorischen Effekt für die Feinregulation durch 3' UTR-miRNA-Interaktionen dar. Außerdem können auch umgeschriebene Fragmente von abgebauten RNAs noch auf den Arrays hybridisieren und Signale erzeugen. Dafür, dass die in der vorliegenden Studie gewählten Filterkriterien recht streng waren, spricht auch, dass für hsa-mir-4423 nur ein Zielgen priorisiert wurde. Unter den in den Microarraydaten herunterregulierten Transkripten fanden sich neben Protein-kodierenden Genen auch nicht-kodierende und als „*novel transcripts*“ eingeordnete RNAs. Im Bereich der Funktionsaufklärung von nicht-kodierenden Genen besteht noch viel Forschungsbedarf und neue Erkenntnisse diesbezüglich werden zukünftig zum Verständnis der Regulation vieler physiologischer und pathologischer Prozesse beitragen.

In der vorliegenden Studie wurden für hsa-mir-199a-1 60 Zielgene, die eine Rolle dieser miRNA in immun-vermittelten Signalwegen nahelegen, priorisiert. Die in der vorliegenden Studie priorisierten Zielgene für hsa-mir-199a-1 waren, bis auf zwei, nicht in miRTarBase hinterlegt [118]. Die Funktionen von hsa-mir-934 und hsa-mir-4423 wurden, wie in Kapitel 6.1 beschrieben, bislang nur vereinzelt untersucht. Für diese beiden miRNAs wurden in der vorliegenden Studie zehn bzw. ein Protein-kodierendes Zielgen priorisiert. TMEM47, das Zielgen von hsa-mir-4423, wird im Gehirn hoch exprimiert [216]. Reife hsa-miR-934-5p-miRNAs wurden bislang erst in wenigen, vorrangig epithelialen, Geweben gemessen, während für hsa-miR-4423-5p/-3p kaum Expressionsdaten vorliegen [183]. Bei hsa-mir-4423 handelt es sich zudem um eine evolutionär junge miRNA. Möglicherweise spielen diese miRNAs nur in spezifischen Zelltypen eine Rolle und eine Untersuchung der Funktion dieser miRNAs in anderen, z.B. auch neuronalen Zelllinien könnte mehr Aufschluss über ihre Funktionen erbringen. Die Verifizierung der in der vorliegenden Studie priorisierten Zielgene wird vorgeschlagen und könnte durch Luciferase-Assays, wie von Hecker *et al.* beschrieben [86], erfolgen. Die Funktionen und insbesondere die Interaktionen der Zielgene könnten durch bioinformatische Analysen, z.B. durch Betrachtung anderer *gene sets* mit Enrichr [164] und systembiologischer Netzwerke mit GeneMANIA [217], weiter analysiert werden.

Bioinformatische Vorhersage-Tools sind für die Identifizierung von Interaktionen von miRNAs mit Zielgenen ohne komplementäre experimentelle Analysen nur bedingt geeignet. Bei der Verwendung solcher Tools muss beachtet werden, dass die zugrunde liegenden Algorithmen Annahmen, wie eine evolutionäre Konservierung der miRNAs, voraussetzen und dies bei Primaten-spezifischen miRNAs, wie hsa-mir-934 und hsa-mir-4423, die Zielenvorhersage einschränken kann [218, 219]. Weiterhin

werden oft die 3' UTR-Sequenzen von Transkripten bei der Zielgenanalyse priorisiert. Während sich Erkennungssequenzen für miRNAs in den 3' UTRs häufen, wurden jedoch auch Bindungsstellen für miRNAs außerhalb von 3' UTRs und in nicht-kodierenden Transkripten beschrieben [220]. Außerdem ist zu beachten, dass die Komplementarität der Zielsequenz mit der *seed* Sequenz der miRNA nicht perfekt sein muss, damit eine Interaktion stattfinden kann [221]. Die Vorhersage der Zielgene von miRNAs durch Algorithmen geht mit einem hohen Anteil Falschpositiver einher, wie in HEK293-Zellen für 20 miRNAs gezeigt wurde [222]. In der gleichen Studie zeigten sich wenige Überschneidungen von Zielgenen zwischen verschiedenen Vorhersagetools. SNPs können neben der Prozessierung auch die miRNA-Funktion beeinflussen, indem die Inkorporation in den miRISC, die *seed* Sequenz der miRNA oder auch Erkennungssequenzen in Zielgenen der miRNAs von der Allelausprägung abhängen [84, 145, 223, 224].

6.3 ZELLTYP- UND KONTEXTSPEZIFISCHE EXPRESSION DER UNTERSUCHTEN MICRORNAS

Die Expression der miRBase-gelisteten Formen und ausgewählten IsomiRs der elf MS-assoziierten pri-miRNAs wurde in 120 B-Zell-Proben von MS-Patienten und gesunden Kontrollen ermittelt. Auch die Expression von miRNA *host* Genen und von Zielgenen von hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934 und hsa-mir-4423 wurde betrachtet. Die relativen Häufigkeiten von B-Zell-Subpopulationen in den Proben und die Verteilung der Genotypen der MIR SNPs und der zugehörigen MS *lead* SNPs wurden untersucht. Die vorliegende Studie hatte einen explorativen Charakter. Insbesondere für eQTL-Analysen zur Bewertung der Effekte von SNPs mit niedrigen MAFs stellt jedoch die begrenzte Größe der Studienkohorte eine wesentliche Einschränkung dar. Zudem ist zu beachten, dass die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse (Fehler 1. Art) größer ist, je mehr statistische Tests berechnet werden. Obwohl sich diese sogenannte Alphafehler-Kumulierung auf die Gesamtfehlerrate bezieht und somit nicht per se die Validität einzelner Tests in Frage stellt, ist hervorzuheben, dass in der vorliegenden Arbeit neben p-Werten stets verschiedene Informationen berücksichtigt wurden, um möglichst konsistente Aussagen treffen zu können (z.B. durch Betrachtung verschiedener IsomiRs, durch Bestätigung von potentiellen Zielgenen mit *in silico* Analysen und durch Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen). Es erfolgte keine zusätzliche Korrektur der p-Werte aus den linearen Modellen, da für die Auswertung von explorativen Studien von Korrekturen für multiples Testen, wie der Bonferroni-Korrektur, eher abgeraten wird, um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fehlern 2. Art (falsch negative Ergebnisse) zu minimieren [225, 226]. Um einzelne Ergebnisse dieser Arbeit zu erhärten, sind weiterführende Studien mit höherer statistischer Power notwendig.

Die Zusammensetzung der Patientenkohorte spiegelt wider, dass mehr Frauen an RRMS erkranken,

während das Verhältnis weiblicher zu männlicher Patienten bei PPMS ausgeglichen ist [50]. Das mittlere Erkrankungsalter bei MS liegt bei rund 30 Jahren [4], was sich auch im Alter und der Erkrankungsdauer der in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten zeigte. Die Gesunden in der Studienkohorte waren jünger. Die Diagnose einer PPMS erfolgt in der Regel später [4], wie es auch bei den untersuchten PPMS-Patienten, welche die älteste Gruppe stellten, der Fall war. Deshalb wurden das Alter, das Geschlecht und auch die Therapie der RRMS-Patienten in den statistischen Analysen stets als erklärende Variablen berücksichtigt.

Die B-Zellen wurden über einen negativen Selektionsansatz angereichert, um eine Aktivierung der Zellen über Oberflächenmarker zu minimieren. Alternativ ist die positive Selektion von B-Zellen anhand der CD19- oder CD20-Oberflächenmoleküle möglich, was eine höhere B-Zell-Reinheit ermöglichen kann [168]. Mittels durchflusszytometrischer Methoden wurden die B-Zell-Subpopulationen in den verschiedenen Studienkohorten charakterisiert.

Naïve B-Zellen machen den größten Anteil der CD19⁺ B-Zellen im peripheren Blut aus. In einer Studie von Morbach *et al.*, in der 32 gesunde Individuen zwischen 26 – 50 Jahren untersucht wurden, belief sich der Anteil der naïven B-Zellen auf ca. 65 % der CD19⁺ Zellen [171]. Sowohl *non-switched* als auch *switched memory* B-Zellen machen laut der gleichen Studie bei Erwachsenen jeweils gut 15 % der CD19⁺ B-Zellen aus. CD27⁺ IgD⁺ *memory* B-Zellen liegen bei ca. 5 %. Für transitionale und für CD21_{low} CD38_{low} B-Zellen gilt, dass sie jeweils rund 2 % der zirkulierenden CD19⁺ Zellen stellen. Für Plasmablasten wurde mit rund 1 % aller CD19⁺ B-Zellen der geringste Anteil gezeigt. Je jünger die Probanden waren, desto höher war die Streuung dieser Anteile [171]. Qualitativ sind die prozentualen Anteile der B-Zell-Subpopulationen in CD19⁺ Zellen aus dem peripheren Blut der in der vorliegenden Studie analysierten 121 cryopräservierten Proben mit denen von Morbach *et al.* beschriebenen vergleichbar. Quantitative Abweichungen waren durch interindividuelle Unterschiede und methodische Unterschiede zu erwarten. So kann die Cryopräservierung von Zellen, welche aus logistischen Gründen für die vorliegende Studie gewählt wurde, einen Einfluss auf die Abundanz von Oberflächenmolekülen haben [168].

Die prozentualen Anteile der in der vorliegenden Studie analysierten B-Zell-Subpopulationen von Gesunden und von RRMS-Patienten vor IRT waren vergleichbar. Das Ziel einer Therapie mit IRT wie Alemtuzumab und Cladribin ist es, durch die vorübergehende Depletion von Immunzellen ein gesundes Immunsystem zu rekonstituieren [69, 227, 228]. Unterschiede in den Anteilen der B-Zellsubpopulationen im Blut von Gesunden und MS-Patienten infolge von therapeutischer Intervention konnten in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. In allen untersuchten Studienkohorten, außer der Gruppe der RRMS-Patienten unter Natalizumab-Therapie, stellten die

naïven CD27⁺ IgD⁺ B-Zellen den größten Anteil der CD19⁺ Zellen dar (32 % – 72 %). Unter Behandlung mit Alemtuzumab und Cladribin waren die Anteile der naïven B-Zellen höher (55,4 % und 72,4 %) und die Anteile der *memory* B-Zellen geringer (7,4 % und 8,9 %) als bei Gesunden und bei MS-Patienten vor IRT. Bei den Rostocker RRMS-Patienten unter Therapie mit Natalizumab war der Anteil der *non-switched memory* B-Zellen mit 43 % im Vergleich zu Gesunden deutlich höher. Die Messungen aus der vorliegenden Arbeit bestätigen die Ergebnisse vorheriger Studien von Thompson *et al.* [71] und Baker *et al.* [229], welche auch erhöhte Anteile naïver B-Zellen und verringerte Anteile von *memory* B-Zellen nach Verabreichung von Alemtuzumab zeigten. Eine weitere Studie von Baker *et al.*, in der die Repopulation von zirkulierenden Lymphozyten infolge eines Behandlungszykluses mit Cladribin untersucht wurde, zeigte ähnliche Ergebnisse [72]. Weiterhin bestätigen Ceronie *et al.* in einer Arbeit von 2018 die Beobachtungen für die beiden Subpopulationen in RRMS-Patienten nach einem Behandlungszyklus mit Alemtuzumab bzw. subcutan verabreichtem Cladribin [230]. In Untersuchungen der Zusammensetzung der peripheren Blutzellen unter Behandlung von RRMS-Patienten mit Natalizumab wurde ein relativer Anstieg der Häufigkeiten von *memory* B-Zellen gezeigt [231–233]. Der Anteil der transitionalen B-Zellen lag in der vorliegenden Arbeit bei allen bis auf zwei Studienkohorten zwischen rund 1 % – 2 %. Bei RRMS-Patienten unter Alemtuzumab war der Anteil mit 2,7 % erhöht und unter Cladribin mit 7,4 % deutlich erhöht; ein Effekt, der während der Repopulation von B-Zellen nach IRT zu erwarten ist [69]. In der vorliegenden Arbeit wurde in PPMS-Patienten und in RRMS-Patienten unter Cladribin-Behandlung ein zweifach höherer Anteil von CD23⁺ B-Zellen gegenüber den anderen Gruppen gezeigt. Für CD23⁺ B-Zellen wurde bereits ein Zusammenhang mit der Aktivierung von B-Zellen, unter anderem nach einer Infektion mit EBV, beschrieben [169, 234].

Unter Verwendung der gewonnenen B-Zell-RNA wurden neben den miRBase-gelisteten reifen miRNA-Formen auch Isoformen quantifiziert. IsomiRs, miRNAs mit Unterschieden in der Länge oder Sequenz, können in 5' und 3' IsomiRs kategorisiert werden. Während 3' IsomiRs häufiger vorkommen, können insbesondere Variationen am 5' Terminus Auswirkungen auf die spezifische Funktion haben [73, 97]. Veränderungen von IsomiR-Expressionsleveln wurden bei verschiedenen Krankheiten beschrieben [174]. Für solche miRNAs, für die nur ein reifes Molekül, entweder vom 3p- oder vom 5p-Strang in der miRBase-Datenbank, gelistet ist, wurde in dieser Arbeit auch jeweils ein Assay zur Messung des mutmaßlichen reifen Moleküls vom anderen Strang designed. Basierend darauf, dass bei der miRNA-Prozessierung durch Microprocessor und Dicer üblicherweise 2 nt Überhänge an den 3' Termini der beiden reifen miRNA-Sequenzen gebildet werden [73], lässt sich die mutmaßliche Sequenz des anderen Strangs vorhersagen. Bei der Beladung von Argonaute mit dem miRNA-Duplex besteht eine Präferenz für den Strang, der am 5' Terminus instabil ist oder der mit einer der Basen A oder U beginnt [100]. Jedoch kann auch der andere Strang in Argonaute inkorporiert werden, wenn auch mit

niedrigerer Frequenz, durch alternative Prozessierung oder nur unter bestimmten Umständen. Für hsa-miR-142-3p und -5p wurden beispielsweise in verschiedenen Geweben unterschiedliche Präferenzen für den reifen Strang gezeigt [235]. Unpräzises Schneiden während oder RNA-Modifikationen nach der miRNA-Prozessierung können außerdem zur Bildung von IsomiRs, die ein bis zwei Basen kürzer oder länger sind, als auch zur IsomiRs mit zusätzlichen Nukleotiden (A oder U) am 3' Terminus führen. Weiterhin können nicht-kanonische, Microprocessor-unabhängige miRNA-Biogenesewege, wie die von 5' *capped* miRNAs, zur Bildung von reifen Molekülen aus anderen Teilen von miRNA-kodierenden Sequenzen führen [236]. In der vorliegenden Arbeit wurden miRNAs auf der Grundlage von Daten in IsomiR Bank [147] und miRCarta [150] ausgewählt und mittels *custom* miRNA-spezifischer *stem-loop* qPCR-Assays quantifiziert.

Die qPCR mit *stem-loop* Primern und TaqMan® miRNA Assays ist eine hochspezifische Methode zur relativen Quantifizierung von miRNAs. Während diese Methode auch für die Unterscheidung von Isoformen, die sich nur um ein Nukleotid unterscheiden, als geeignet gilt [158, 174, 175], wurde für 3' Isoformen von hsa-miR-222-3p [237] und hsa-miR-877-5p [238] eine geringe Spezifität gezeigt. Für sechs miRNA-Assays, darunter solche für hsa-mir-3661 und hsa-mir-4252, konnten in der vorliegenden Studie trotz prä-Amplifikation und innerhalb von 45 PCR-Zyklen keine reifen miRNAs in B-Zellen nachgewiesen werden. Möglicherweise werden sie nur in spezifischen Zellen und unter spezifischen Umständen exprimiert [239]. Laut einer NGS-Studie von 2010 [187], wird hsa-miR-548ac-3p in humanen B-Zellen exprimiert. In der vorliegenden Untersuchung konnte diese miRNA zwei Dritteln der Proben jedoch nicht per qPCR nachgewiesen werden. Bei Molekülen mit geringer Kopienzahl, welche erst in späten Amplifikationszyklen detektierbar sind, ist aufgrund der Poisson-Verteilung eine hohe Variation der C_T -Werte zu beobachten [240, 241]. Für miRNAs, die in einem Teil der Proben nicht nachgewiesen werden konnten, wurden über einen Algorithmus der McCall-Gruppe [176] plausible C_T -Werte basierend auf der Anzahl und der Höhe der detektierten Werte berechnet. Andere Ansätze zur Handhabung von fehlenden Daten von nicht detektierten Molekülen setzen den C_T -Wert für diese Fälle artifiziell auf die maximale Zykluszahl oder lassen fehlende Daten aus den weiteren Berechnungen heraus, was mitunter zu einer starken Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Der für die vorliegende Studie genutzte Imputing-Algorithmus der McCall-Gruppe verringert diesen Fehler. Die Diskriminierung von insbesondere 3' IsomiRs könnte durch spezielle Methoden, wie der Dumbbell-PCR [242] oder einer modifizierten Form der Polyadenylierungsbasierten qPCR [237], verbessert werden. Die Nutzung der *droplet digital* PCR, welche die sehr sensitive absolute Quantifizierung von miRNAs erlaubt und nicht auf eine Normalisierung anhand von Referenzgenen oder –miRNAs angewiesen ist, könnte insbesondere die Quantifizierung von niedrig exprimierten miRNAs deutlich akkurate gestalten [243, 244].

In der vorliegenden Studie wurden 22 reife miRNAs und IsomiRs, die aus neun verschiedenen miRNA-kodierenden Loci stammen, erfolgreich und erstmals per qPCR in B-Zellen von MS-Patienten nachgewiesen. Für 13 reife Moleküle von hsa-mir-26a-2, hsa-mir-199a-1, hsa-mir-4304, hsa-mir-4423, hsa-mir-4464 und hsa-mir-4492 konnten in der vorliegenden Studie signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Studienkohorten bestimmt werden. Für reife hsa-miR-26a-5p-Moleküle insbesondere bei RRMS-Patienten unter Natalizumab-Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine höhere Expression. Unter Alemtuzumab- und Cladribin-Behandlung wurde hingegen eine leicht verringerte Expression von Molekülen aus diesem Locus beobachtet. Womöglich kann eine Behandlung mit IRT eine Fehlregulation von hsa-mir-26a bei MS korrigieren. Für reife hsa-miR-199a-5p und -3p-Moleküle wurde bei RRMS-Patienten unter Alemtuzumab- oder Cladribin-Therapie eine relativ hohe Expression gezeigt. Die Level von hsa-miR-4304-5p und -3p sowie von der miRBase-annotierten hsa-miR-4464-5p waren in RRMS-Patienten unter Therapie mit Cladribin im Vergleich zu Gesunden und MS-Patienten vor IRT erhöht. In vorherigen Studien wurde eine differentielle Expression von hsa-miR-26a-5p und reifen Molekülen der hsa-mir-199a-Familie im Kontext von MS bereits mehrfach beschrieben: Im Vergleich zu gesunden Kontrollen wurde eine höhere Expression von hsa-miR-26a-5p im Serum vom PPMS-Patienten [245] und in Lymphozyten von RRMS-Patienten im Schub [246] gemessen. Eine Herunterregulation der hsa-miR-26a-5p-Expression wurde in PBMC von MS-Patienten unter Natalizumab-Therapie gezeigt [247]. In PBMC von MS-Patienten unter Behandlung mit IFN- β wurde bei Ansprechen (kein Anstieg des EDSS-Werts und keine Rückfälle während der sechsmonatigen Nachbeobachtungszeit) gegenüber nicht-Ansprechen auf IFN- β eine vierfach erhöhte Expression von hsa-miR-26a-5p gemessen [248]. In Exosomen aus dem Serum von RRMS-Patienten, die auf eine IFN- β -Therapie ansprechen, wurde eine höhere hsa-miR-26a-5p-Expression festgestellt, als bei Therapie-naïven Probanden und nicht-Ansprechen [249]. Im Liquor von RRMS-Patienten verglichen mit Kontrollen wurden verringerte hsa-miR-199a-3p-Level gezeigt [250]. In PBMC von MS-Patienten wurde eine niedrigere Expression von hsa-miR-199a-5p im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt [251]. Eine erhöhte Expression von reifen hsa-mir-199a-Molekülen wurde hingegen in CD4 $^+$ T-Zellen von RRMS-Patienten in der Remission gegenüber RRMS-Patienten im Schub und gesunden Kontrollen gemessen [252]. Außerdem wurde berichtet, dass die Expression von hsa-miR-199a-5p im Serum von MS-Patienten mit dem Behinderungsgrad korreliert [136]. Eine detaillierte Analyse der miRNA-Expression, z.B. vor und nach einem Behandlungszyklus oder mehreren Behandlungszyklen mit Cladribin oder Alemtuzumab im Zeitverlauf ist anhand der für die vorliegende Studie erhobenen Daten möglich und wird in weiterführenden Arbeiten der Sektion Neuroimmunologie in Rostock verfolgt.

Durch die Untersuchung von miRNA-Isoformen konnten 3' Isoformen von fünf reifen miRNAs

nachgewiesen werden, teilweise mit höheren Expressionsleveln als für die miRBase-gelisteten Formen. Für vier miRNAs, hsa-mir-548ac, hsa-mir-934, hsa-mir-4304 und hsa-mir-4464, für die bei miRBase nur eine reife miRNA, entweder aus dem 3p- oder 5p-Strang, gelistet ist, konnten in der vorliegenden Studie auch für den anderen Strang reife Moleküle in den B-Zellen detektiert werden. Dabei ist hsa-miR-4304-3p, welche in allen Proben detektierbar war, besonders hervorzuheben. Eine IsomiR von hsa-miR-4464-5p, die mutmaßlich entsteht, wenn die enzymatische Spaltung 4 nt später erfolgt als bei der miRBase-annotierten Variante, konnte in der Mehrheit der Proben (72 %) nachgewiesen werden, was Expressionsdaten aus der Datenbank miRCarta bestätigt [150]. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die Heterogenität von reifen miRNAs und ihren IsomiRs, die in der Referenzdatenbank miRBase [81] nicht abgebildet ist. Effekte durch Medikamente oder andere Stimuli auf IsomiR-Level wurden im Kontext von MS bislang nicht betrachtet. *In vitro*-Untersuchungen demonstrierten, dass die Expression von reifen miRNA-Isoformen in Reaktion auf externe Stimuli verändert werden kann, wie in Fibroblasten für Moleküle aus dem hsa-mir-222-Locus in Reaktion auf IFN- β -Stimulation gezeigt werden konnte [253]. In Makrophagen, welche mit bakteriellen Molekülen stimuliert wurden, konnten ebenfalls spezifische Effekte auf die Expression verschiedener IsomiRs beobachtet werden [254]. Die allgemein übliche Beschränkung auf die Quantifizierung von miRBase-gelisteten miRNAs in den bisherigen Studien führt zu einer etwas unvollständigen und unausgewogenen Datenlage, die bei der Interpretation von Ergebnissen bedacht werden sollte. Hilfreich wäre es in jedem Falle, wenn in miRNA-Studien die genauen reifen Formen, die untersucht wurden, stets angegeben werden, z.B. als RNA-Sequenz oder anhand der von Cloonan *et al.* vorgeschlagenen Nomenklatur [98]. Die Relevanz von IsomiRs bedarf zukünftig weiterer Aufklärung, womöglich mit *small RNA sequencing* NGS-Studien. Andere Isoformen, über die in dieser Studie untersuchten hinaus, könnten bei Erkrankungen dysreguliert sein oder über die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression anderer Zielgene als derer der kanonischen miRNAs bei Erkrankungen eine Rolle spielen.

Für die Risikoallele der MS-assoziierten SNPs in den miRNA-kodierenden Sequenzen wurden im Vergleich der MS-Patienten mit den Gesunden teils ORs > 1 in Übereinstimmung mit der jüngsten GWAS [36] berechnet. Für den SNP rs1414273 konnte in der vorliegenden Studie mit einer Kohortengröße von $n = 91$ eine signifikante Assoziation des Genotyps mit MS (OR = 2,52) bestätigt werden. Insbesondere für die SNPs in den miRNAs hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934, hsa-mir-3661, hsa-mir-4304, hsa-mir-4423 und hsa-mir-4464, für die eine Allel-abhängige Prozessierung im Zellkultur-Experiment festgestellt wurde, wäre es interessant, den genetischen Zusammenhang mit MS in einer deutlich größeren Kohorte oder Familien-basierten Studie zu untersuchen. Vier der sechs SNPs, für die diese Allel-abhängigen Effekte auf die miRNA-Prozessierung in Zellkultur gezeigt wurden,

lagen in der Studienkohorte nur in einer Genotypausprägung vor. Für rs1005039, der nahe der hsa-mir-199a-1-kodierenden Sequenz liegt, gab es nur vier heterozygote Risikoallelträger und anhand dessen konnte in dieser Studienkohorte kein eQTL-Effekt auf dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ nachgewiesen werden. Für rs817478, mit einer MAF von 15 % in der vorliegenden Studie, und hsa-mir-4423 konnte die Allel-abhängige Prozessierung im Zellkultur-Experiment durch eQTL-Analysen in B-Zellen bestätigt werden. Das MS-Risikoallel rs817478A war in der vorliegenden Studie mit geringeren Expressionsleveln von hsa-miR-4423-5p assoziiert, was eQTL-Analysen auf Basis von NGS-Daten [142] bestätigt.

Die Kombination der Ergebnisse der Zellkultur-Experimente und der *in vivo* Analysen zeigt erstmals, dass die Level dieser miRNA kausal vom Genotyp von rs817478 abhängig sind. Weiterhin konnten in B-Zellen für die Expression von hsa-miR-26a-2-3p und den Genotyp von rs701006, für CTDSP2 und rs41292017 sowie für das X-chromosomal kodierte Gen VGLL1 und rs2807267 eQTL-Effekte festgestellt werden. Limitierend ist für die vorliegende Untersuchung zu betrachten, dass das selteneren Allel von rs41292017 nur bei zwei Probanden heterozygot vorlag. Hsa-mir-26a-2 wird intronisch von CTDSP2 und hsa-mir-934 wird intronisch von VGLL1 kodiert. Die miRNAs werden zunächst gemeinsam mit den *host* Genen transkribiert. Signifikante eQTL-Effekte für die SNPs wurden jedoch nur für jeweils eine reife miRNA oder das *host* Gen aus den jeweiligen Loci berechnet. Eine ähnliche Entkopplung der Expression reifer miRNAs und ihrer *host* Gene wurde 2019 für 27 miRNA – *host* Gen-Paare im Zusammenhang mit SNPs beschrieben [86]. Im Jahr 2019 wurde in eQTL-Analysen gezeigt, dass das MS-assozierte Allel von rs1414273 in PBMC und immortalisierten Lymphozyten von MS-Patienten mit erhöhten hsa-miR-548ac-3p-Leveln einhergeht [86]. Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Studie anhand der Daten aus B-Zellen nicht bestätigt, was darauf zurückzuführen ist, dass in den untersuchten B-Zellen hsa-miR-548ac-3p in zwei Dritteln der Proben nicht detektierbar war. Eine Validierung der beobachteten Effekte in einer größeren Kohorte, in der die jeweiligen selteneren Allele häufiger vorliegen, ist nötig. Für die Expression von reifen miRNAs in eQTL-Datenbanken wie dem GTEx-Portal [34] liegen derzeit noch keine Informationen vor. Die Aufnahme von miRNA-Expressionsdaten, basierend auf verbesserten *high throughput* Methoden [255], in eQTL-Datenbanken wird die Untersuchung von miR-eQTLs in naher Zukunft unterstützen. Dabei ist zu beachten, dass für eQTLs zelltyp- [213], kontext- [256–258] und populationsspezifische [259, 260] Effekte beschrieben worden sind; Faktoren, welche auch in eQTL-Datenbanken berücksichtigt werden sollten.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die Transkriptomprofile der B-Zellen von 121 Studienteilnehmern erhoben. Für die sechs an der miRNA-Biogenese beteiligten Gene AGO2, DGCR8, DICER1, DROSHA, TARBP2 und XPO5 lagen die Expressionswerte zwischen den Studienkohorten mit Interquartilsabständen von $< 0,73$ recht eng beieinander. Für AGO2, DGCR8 und TARBP2 war die

Expression bei Gesunden, PPMS- und RRMS-Patienten vor IRT ähnlich. Unter Cladribin-Therapie war die AGO2- und DGCR8-Expression am höchsten und unter Natalizumab-Therapie am niedrigsten. Die DROSHA-Expression war in der Kohorte aller MS-Patienten geringfügig höher als bei den gesunden Kontrollen. Für DICER1 und XPO5 wurden keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den Studienkohorten festgestellt. In einer Studie von Jafari *et al.* wurde für DROSHA im Blut von RRMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls eine höhere Expression gemessen [261]. In der gleichen Studie wurde außerdem eine höhere Expression von DGCR8 und DICER1 bei MS-Patienten gezeigt. In B-Zellen von MS-Patienten verglichen mit Gesunden wurde hingegen eine verringerte Expression von DICER1 festgestellt [262]. In einer weiteren Studie wurden in Lymphozyten aus dem peripheren Blut von MS-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen niedrigere Dicer-Protein-, aber nicht mRNA-Level gemessen [263]. In der gleichen Studie waren die Dicer-Proteinlevel bei Ansprechen auf IFN- β -Therapie im Vergleich zu MS-Patienten vor IFN- β -Therapie wiederum höher. Für AGO2 wurde im peripheren Blut von MS-Patienten, die mit IFN- β behandelt wurden, verglichen mit gesunden Kontrollen eine höhere Expression gezeigt [264]. Im experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis-Mausmodell gegenüber nicht-immunisierten Mäusen waren die Level von AGO2 in Oligodendrozyten und Hirn-infiltrierenden T-Zellen verringert [265].

In der vorliegenden Studie wurden außerdem die B-Zell-Expressionswerte der fünf miRNA *host* Gene analysiert. Für PTPNM2 bzw. VGLL1 war die mRNA-Expression in der Studienkohorte mit log2-Werten von ca. 4,5 bzw. 3,0 niedrig. JAK1 wurde von allen *host* Genen am höchsten exprimiert (log2-Werte > 14,0). Auch im *cell type atlas* (proteinatlas.org) [216] ist JAK1 mit einem normalisierten RNA-Expressionswert von 120 in B-Zellen hoch exprimiert. CD58 und CTDSP2 werden laut den Daten im *cell type atlas* in allen Blut- und Immunzellen moderat bis hoch exprimiert. PTPNM2 wird in geringem Maße in B-Zellen und anderen Blut- und Immunzelltypen, jedoch vermehrt in neuronalen Zellen exprimiert [216]. VGLL1 wird nicht in B-Zellen, sondern nur sehr selektiv in Hofbauer-Zellen und insbesondere Trophoblasten exprimiert [216]. Die Untersuchung der Level von hsa-mir-934, welche im VGLL1-Locus kodiert wird, in spezifischen Zelltypen, für die eine hohe Expression von VGLL1 bekannt ist, könnte weitere Erkenntnisse zur Funktion dieser miRNA erbringen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde eine kleine, im Zusammenhang mit den untersuchten miRNAs stehende Auswahl der > 130.000 auf den Clariom D-Arrays gemessenen Transkripte betrachtet. Die vorliegenden Transkriptomprofile erlauben nicht nur die Analyse von differentiell exprimierten, sondern auch alternativ gespleißen Transkripten. Die weitere Auswertung der RNA-Profile im Vergleich der RRMS- und PPMS-Patienten und Kontrollen und im Therapievergleich, auch longitudinal, ist im Fokus weiterer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe.

Die Untersuchung der Zelltyp- und Kontext-spezifischen Expression von miRNAs und miR-eQTLs ist von

hoher Relevanz für die Aufklärung ihrer Funktionen und ihrer Rolle bei Erkrankungen. Für die MS birgt die Untersuchung von miRNAs in Immunzellen, wie B- und T-Zellen, oder noch diffizileren Subpopulationen sowie in Zellen des ZNS, wie Microglia, oder in Geweben, wie MS-Läsionen, besonderes Potential, um pathologische Mechanismen besser zu verstehen [266]. In T-Zellen inhibiert hsa-mir-26a die Expression von IL-6 und hemmt darüber hinaus die Differenzierung von Th17-Zellen im Tiermodell der MS [267]. Die Dysregulation von weiteren miRNAs, wie hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-223-3p, in T-Zellen und eine Rolle der miRNAs in der Regulation der T-Zell-Differenzierung bei MS wurde in einem Übersichtsartikel von 2018 dargestellt [268]. Diese miRNAs wurden in einem Reviewartikel von 2019 als Regulatoren der Aktivierung des Inflammasoms sowohl im Kontext der MS als auch im Kontext anderer immunvermittelter neurologischer Erkrankungen beschrieben [128]. Insbesondere die Untersuchung der Expression von miRNAs in Blutzellen und -kompartimenten, wie Exosomen, als leicht zugängliche Biomaterialien, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung zur Entdeckung von Biomarkern zur Diagnose, Prognose und dem Monitoring bei MS [59, 269, 270]. MiRNAs von Viren, wie EBV, wofür bekannt ist, dass eine Infektion mit der Pathogenese der MS assoziiert ist [271], können für die Erforschung der MS interessant sein. Für drei EBV-miRNAs wurden in einem Review von 2020 Rollen bei MS beschrieben [125]. So sind z.B. die Level von ebv-miR-BHRF1-2-5p und ebv-miR-BHRF1-3 im Blut von EBV-infizierten MS-Patienten gegenüber Gesunden erhöht. Die regulatorischen Interaktionen zwischen humanen und nicht-humanen miRNAs und Genen sind bislang großteils unverstanden und bedürfen daher weiterer Forschungsanstrengungen. Weiterhin können Interaktionen von genetischen Risikofaktoren und Umwelt-/Lebensstileinflüssen gemeinsam zu deutlich höheren synergistischen ORs für das MS-Risiko führen, als additiv zu erwarten wäre, wie bereits für die Kombination von Übergewicht im Alter von 20 Jahren bzw. Rauchen und MS-assoziierte HLA-Varianten beschrieben wurde [15]. Es ist geplant, Restmaterial der für die vorliegende Studie gesammelten RNA-Proben aus B-Zellen zukünftig dafür zu nutzen, virale miRNAs zu messen bzw. Zusammenhänge zwischen Umwelt- und genetischen Risikofaktoren zu untersuchen.

6.4 DIE BEDEUTUNG VON MICRORNAs ALS BIOMARKER UND THERAPEUTISCHE ZIELMOLEKÜLE BEI MS

MiRNAs wurden erstmals im Jahr 1993 in *C. elegans* beschrieben [272, 273]. Zehn Jahre später wurde ihre Rolle als Klasse wichtiger Regulatoren der Genexpression auch in Säugertieren erkannt und seitdem ist die Anzahl der Publikationen zu miRNAs in PubMed nahezu exponentiell angestiegen [274–276]. Einige miRNAs sind an der Neurogenese, der Differenzierung von Oligodendrozyten, dem Wachstum von Axonen sowie der Bildung von Myelin beteiligt [277]. Für andere miRNAs, wie unter

anderem hsa-mir-9, hsa-mir-79, hsa-mir-124, hsa-mir-132, hsa-mir-134 und hsa-mir-137, wurde eine Rolle für die neuronale Entwicklung und Plastizität und die Ausbildung von Synapsen und Dendriten gezeigt [278]. Weitere miRNAs spielen bei der Regulation von immunologischen Prozessen eine zentrale Rolle und für verschiedene immunologisch-vermittelte Erkrankungen, wie auch die MS, wurden Veränderungen in der miRNA-Expression gezeigt [128, 279, 280]. Die Dysregulation von einigen miRNAs wurde bereits im Blut, im Liquor und in weiteren Kompartimenten von Patienten mit MS beschrieben [122, 281]. Die Erforschung der Rolle von miRNAs bei Erkrankungen kann zukünftig zur Entdeckung von Biomarkern und Entwicklung von miRNA-basierten Therapieansätzen beitragen.

Die Diagnose der MS nach den McDonald-Kriterien ist erst nach der Entwicklung erster neurologischer Schäden und der klinischen Manifestation von MS möglich [54]. Laut einer Studie von Cortese *et al.* ist bereits bis zu zwei Jahre vor der klinischen Manifestation erster MS-Symptome (präklinisch) eine geringere kognitive Performance als bei Kontrollen, die keine MS entwickeln, zu beobachten [282]. Biomarker, die auf eine präklinische MS hinweisen, sind bislang nicht bekannt. Zudem sind der klinische Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen nicht gut mit den derzeit in der Klinik verwendeten Biomarkern korreliert [122]. Es besteht also der Bedarf nach neuen, spezifischeren Biomarkern.

Da MS vorrangig eine Erkrankung des Immunsystems ist, sind aus dem Blut abgeleitete Biomarker von großem Interesse. Der Liquor stellt ebenfalls ein mögliches Reservoir für MS-Biomarker direkt aus dem ZNS dar. Bei der Gewinnung des Liquors handelt es sich jedoch um ein invasives Verfahren, welches mit einem größeren Aufwand, als es die Entnahme von peripherem Blut erfordert, verbunden ist [283]. MiRNAs weisen in Körperflüssigkeiten eine hohe Stabilität auf und ihre Quantifizierung durch sensitive Methoden ist gut handhabbar. In einem Übersichtsartikel von 2020 sind rund 50 miRNAs, darunter auch bislang funktionell wenig beschriebene miRNAs, wie hsa-miR-942-5p, aus verschiedenen Blut- und Liquor-Bestandteilen als potentielle Biomarker bei MS aufgeführt [122]. MiRNAs, die erst seit ein paar Jahren annotiert sind, wie die in der vorliegenden Arbeit analysierten miRNAs mit hoher dreistelliger bzw. vierstelliger Nummer, wurden bislang kaum als potentielle MS-Biomarker untersucht: Studien wie von Nuzziello *et al.* [284], in der hsa-miR-942-5p untersucht wurde, und Ahlbrecht *et al.* [285], in der hsa-miR-922-3p quantifiziert wurde, verdeutlichten, dass die Nutzung von solchen miRNAs als Biomarker bei MS plausibel ist. Wie in Kapitel 6.3 näher beschrieben, wurden für hsa-miR-26a-5p und hsa-miR-199a-3p bereits Dysregulationen bei MS gezeigt. Nach bisherigem Kenntnisstand reichen einzelne miRNAs nicht für genaue Vorhersagen zur Diagnose, Prognose und dem Monitoring bei MS aus [132]. Für die Kombination von mehreren miRNAs in Biomarker-Panels wurde gezeigt, dass durch solche Panels genauere Vorhersagen möglich sind. So ermöglicht z.B. die Kombination von hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p und hsa-miR-155-5p in PBMC eine bessere

Stratifizierung von RRMS-Patienten und gesunden Kontrollen [132, 286].

Was die Therapie der MS angeht, gab es in den letzten Jahren aufgrund der Entwicklung von hochwirksamen IRTs große Fortschritte [18]. Dennoch sprechen nicht alle MS-Patienten auf die verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten optimal an und es sind erhebliche Nebenwirkungen von MS-Therapeutika bekannt [287]. Zu den schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen zählen die Reaktivierung latenter Infektionen wie Tuberkulose, das Risiko von Herpes Zoster-Ausbrüchen, Influenza-Infektionen und die Entwicklung sekundärer immunvermittelter Erkrankungen [69, 228, 288, 289]. Daher ist die Entwicklung neuer Therapieansätze, insbesondere für die progradienten Verlaufsformen von MS und zur Anregung der neuronalen Regeneration, weiterhin von hoher Relevanz. Dabei könnten Moleküle, welche z.B. mit pathologischen T- oder B-Zell-Mechanismen, wie der Immunzelldifferenzierung, interferieren, von therapeutischem Nutzen sein [22, 266]. Die pharmakologische Manipulation der Spiegel von miRNAs durch die Verabreichung von miRNA-Mimetika oder AntagomiRs, welche miRNAs hemmen, könnte pathologischen Prozessen entgegenwirken und zur Reduzierung der Häufigkeit von Schüben oder zur Verlangsamung der Krankheitsprogression führen [290, 291]. Die sichere und wirksame Verabreichung stellt aktuell die größte Herausforderung für die Entwicklung von miRNA-Therapeutika dar [292]. Mehrere Methoden zur Stabilisierung und Verabreichung von miRNA-Mimetika und AntagomiRs, basierend auf chemischen Modifikationen, viralen Trägern, Liposomen, Nanopartikeln und extrazellulären Vesikeln, insbesondere Exosomen [278, 293], wurden in den letzten Jahren intensiv beforscht. Im Register clinicaltrials.gov zu klinischen Studien an Menschen waren zum 24. Mai 2021 29 laufende Studien zu den Schlagwörtern „microRNA“ und „Exosomes“ verzeichnet. Bonneau *et al.* beschrieben in einem Übersichtsartikel von 2019 [276], dass sieben Firmen an der Entwicklung von miRNA-basierten Diagnosesystemen und zehn Unternehmen an der Entwicklung von miRNA-Therapeutika arbeiten. Fünf miRNA-basierte Diagnostika sind bereits auf dem Markt verfügbar [276]; bislang sind darunter jedoch noch keine Diagnostika für neurodegenerative Erkrankungen. Unter den miRNA-Therapeutika ist Miravirsen, ein *antisense*-Oligonukleotid als Inhibitor von hsa-miR-122-5p, welches für die Behandlung von Hepatitis C untersucht wird, das erste, für das in einer Phase II klinischen Studie positive Ergebnisse gezeigt werden konnten [294, 295]. Die weitere Optimierung von miRNA-Therapeutika in Bezug auf ihre Verträglichkeit, Stabilität und Wirksamkeit hat das Potential in den kommenden Jahren ein breites Spektrum erfolgreicher miRNA-basierter Medikamente für die Behandlung auch von immunvermittelten Erkrankungen, wie MS, hervorzubringen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die immunvermittelte neurodegenerative Erkrankung MS betrifft weltweit mehr als 2,8 Millionen Menschen. Mehr als 200 genetische Regionen, die mit einem erhöhten Risiko an MS zu erkranken assoziiert sind, wurden in genomweiten Assoziationsstudien identifiziert. Die vermeintlich kausalen SNPs, deren verschiedene Allelausprägungen mit Unterschieden in molekularen Prozessen im Zusammenhang mit MS einhergehen, sind für die meisten dieser Loci bislang nicht bekannt. MiRNAs, kleine nicht-kodierende RNAs, können als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression wirken. Für verschiedene miRNAs wurde gezeigt, dass ihre Dysregulation zu pathologischen Veränderungen in der Entwicklung und zu Krankheits-assoziierten Phänotypen führt. Auch im Zusammenhang mit MS wurde die Expression von miRNAs in bestimmten Zellen und Geweben im Vergleich zu nicht an MS Erkrankten bereits als verschiedenartig beschrieben.

Mittels Datenbanken-basierten Ansätzen (*in silico*) wurden miRNAs, die genetisch mit MS assoziiert sind, bestimmt. In Zellkulturexperimenten (*in vitro*) wurde der Einfluss von SNPs in oder nahe der miRNA-kodierenden Sequenzen auf die Effizienz des wichtigsten Schrittes der miRNA-Biogenese, der enzymatischen Spaltung durch Microprocessor, untersucht und die regulatorischen Funktionen der miRNAs wurden durch die Identifizierung möglicher Zielgene beleuchtet. In B-Zellen aus dem peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Kontrollen (*in vivo*) wurden die Expressionslevel von 22 aus den miRNA-kodierenden Sequenzen entstehenden reifen miRNAs und IsomiRs analysiert. Die Transkriptomprofile der B-Zellen wurden mit Clariom D-Arrays erhoben und die Expression von an der miRNA-Biogenese beteiligten Genen, miRNA *host* Genen und miRNA-Zielgenen untersucht. Die Genotypen von 23 MS-assoziierten SNPs wurden bestimmt. Assoziationen zwischen der miRNA-Expression bzw. der Expression von miRNA *host* Genen und den Genotypen der MS-assoziierten SNPs wurden betrachtet. Die B-Zellen wurden außerdem anhand von Oberflächenmarkern charakterisiert.

Für die vorliegende Studie wurden elf MS-assoziierte miRNAs und 13 zugehörige MIR SNPs priorisiert. Für die vier miRNAs hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934, hsa-mir-4304 und hsa-mir-4464 konnte eine erhöhte und für hsa-mir-3661 und hsa-mir-4423 eine verringerte Effizienz der miRNA-Prozessierung im Zusammenhang mit den MS-Risikoallelen der MIR SNPs *in vitro* gezeigt werden, was auf eine kausale Rolle dieser miRNAs für die genetische Prädisposition für MS hinweist. Für hsa-mir-199a-1 wurden 60 und für hsa-mir-934 zehn großteils neue Zielgene, die unter anderem an immunologischen Prozessen beteiligt sind, bestimmt. Für die Analysen *in vivo* wurden aus Blutproben (n = 121) von PPMS- und RRMS-Patienten (n = 63), letztere unter anderem vor und nach Verabreichung von IRT, und gesunden Kontrollen (n = 28) PBMC, B-Zellen, B-Zell-RNA und DNA isoliert und asserviert. Unterschiede in den relativen Anteilen von Subpopulationen von CD19⁺ B-Zellen zwischen den Studienkohorten wurden

insbesondere infolge von IRT festgestellt. Zwei Risikoallele aus den Genomloci von hsa-mir-548ac und hsa-mir-934 waren in der MS-Kohorte besonders deutlich überrepräsentiert (OR > 2,0). Bei zehn der 23 SNPs trat ein Allel nicht oder nur sehr selten (< 5 %) in der Kohorte auf. Die Untersuchung der B-Zell-RNA ergab eine differentielle Expression von 13 reifen miRNAs und IsomiRs aus den sechs miRNA-kodierenden Loci von hsa-mir-26a-2, hsa-mir-199a-1, hsa-mir-4304, hsa-mir-4423, hsa-mir-4464 und hsa-mir-4492 zwischen den Studienkohorten. Die höhere Expression von hsa-mir-26a-2 und die niedrigere Expression von hsa-mir-199a-1 in MS-Patienten gegenüber Gesunden bestätigt Ergebnisse vorheriger Studien, während die anderen vier miRNAs bislang noch nie bei MS untersucht wurden. Die Analyse der IsomiRs zeigte, dass diese Moleküle ähnlich stark oder sogar höher exprimiert waren als die in der online-Datenbank miRBase gelisteten miRNAs. Für hsa-mir-4304 ist dort nur eine 5p-miRNA beschrieben, in der vorliegenden Studie konnte jedoch auch eine reife 3p-Form in allen untersuchten Proben detektiert werden. Nur einer der sechs SNPs, für die in Zellkultur ein Effekt auf die miRNA-Prozessierung gesehen wurde, hatte in der Studienkohorte eine Häufigkeit des selteneren Allels von über 5 %. Für diesen SNP zeigte auch die eQTL-Analyse in B-Zellen, dass das MS-Risikoallel rs817478A mit geringeren Expressionsleveln von hsa-miR-4423-5p assoziiert war. Dieser eQTL-Effekt bestätigt das Ergebnis aus einer Populationsstudie auf Basis von Daten aus NGS-Experimenten. Der SNP rs817478 liegt in einem für die Microprocessor-Erkennung wichtigen Sequenzmotiv (CNNC). Für die *host* Gene CTDSP2 bzw. VGLL1 von hsa-mir-26a-2 bzw. hsa-mir-934 wurde ebenfalls eine geringere Expression in Abhängigkeit von den MS-Risikoallelen von rs41292017 bzw. rs2807267 festgestellt. Für hsa-miR-26a-2-3p bestand in der Studienkohorte zudem eine Assoziation des MS-Risikoallels von rs701006 mit einer höheren miRNA-Expression. VGLL1 und hsa-mir-934 sind auf dem X-Chromosom lokalisiert. Weiterhin konnte für acht der 60 identifizierten Zielgene von hsa-mir-199a-1 eine signifikante negative Korrelation ihrer Expression mit der der reifen miRNA-Moleküle gezeigt werden. Durch die Integration verschiedener Daten aus Datenbanken, Zellkulturexperimenten und aus der Analyse von humanen Proben (DNA-, RNA-, miRNA- und Zellebene) verbessern die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit das Verständnis von miRNA-medierten molekularen Mechanismen, die am genetischen Risiko für MS beteiligt sind. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Studie weitere miRNA-kodierende Sequenzen in der Nähe von MS-assozierten *lead* SNPs identifiziert, die jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit standen, da hier mutmaßlich andere Mechanismen zugrunde liegen. Die differentielle Expression von verschiedenen miRNAs in MS-Patienten gegenüber Gesunden und bei Therapie-Ansprechen gegenüber nicht-Ansprechen wurde bereits in anderen Studien gezeigt. Die Aufklärung der pathophysiologischen Bedeutung von miRNAs könnte zukünftig Auswirkungen für die Entwicklung von miRNA-basierten Therapieansätzen für MS haben.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Murray TJ (2005) Multiple sclerosis. The history of a disease. Demos Medical Pub, New York
 2. Selmi C, Mix E, Zettl UK (2012) A clear look at the neuroimmunology of multiple sclerosis and beyond. *Autoimmun Rev* 11(3):159–162. doi:10.1016/j.autrev.2011.05.006
 3. Lassmann H (2018) Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(3). doi:10.1101/cshperspect.a028936
 4. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, Robertson N, La Rocca N, Uitdehaag B, van der Mei I, Wallin M, Helme A, Angood Napier C, Rijke N, Baneke P (2020) Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler* 26(14):1816–1821. doi:10.1177/1352458520970841
 5. The Multiple Sclerosis International Federation (2020) *Atlas of MS*, 3rd Edition (September 2020)
 6. Wallin MT, Culpepper WJ, Nichols E, Bhutta ZA, Gebrehiwot TT, Hay SI, Khalil IA, Krohn KJ, Liang X, Naghavi M, Mokdad AH, Nixon MR, Reiner RC, Sartorius B, Smith M, Topor-Madry R, Werdecker A, Vos T, Feigin VL, Murray CJL (2019) Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 18(3):269–285. doi:10.1016/S1474-4422(18)30443-5
 7. Holstiege J, Steffen A, Goffrier B, Bätzing J (2017) Epidemiologie der Multiplen Sklerose – Eine populationsbasierte deutschlandweite Studie, 17. Aufl. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland. doi:10.20364/VA-17.09
 8. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15(9):545–558. doi:10.1038/nri3871
 9. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009) The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132(5):1175–1189. doi:10.1093/brain/awp070
 10. Tomassini V, Matthews PM, Thompson AJ, Fuglø D, Geurts JJ, Johansen-Berg H, Jones DK, Rocca MA, Wise RG, Barkhof F, Palace J (2012) Neuroplasticity and functional recovery in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 8(11):635–646. doi:10.1038/nrneurol.2012.179
 11. Küçükali Ci, Kürtüncü M, Çoban A, Çebi M, Tüzün E (2015) Epigenetics of multiple sclerosis: an updated review. *Neuromolecular Med* 17(2):83–96. doi:10.1007/s12017-014-8298-6
 12. Boziki MK, Kesidou E, Theotokis P, Mentis A-FA, Karafoulidou E, Melnikov M, Sviridova A, Rogovski V, Boyko A, Grigoriadis N (2020) Microbiome in Multiple Sclerosis; Where Are We, What We Know and Do Not Know. *Brain Sci* 10(4). doi:10.3390/brainsci10040234
 13. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL (2018) Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 97(4):742–768. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.021
-

14. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I (2015) Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol* 14(3):263–273. doi:10.1016/S1474-4422(14)70267-4
 15. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L (2017) Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 13(1):25–36. doi:10.1038/nrneurol.2016.187
 16. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T (2015) Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 14(4):406–419. doi:10.1016/S1474-4422(14)70305-9
 17. Danikowski KM, Jayaraman S, Prabhakar BS (2017) Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J Neuroinflammation* 14(1):117. doi:10.1186/s12974-017-0892-8
 18. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358(7):676–688. doi:10.1056/NEJMoa0706383
 19. Staun-Ram E, Miller A (2017) Effector and regulatory B cells in Multiple Sclerosis. *Clin Immunol* 184:11–25. doi:10.1016/j.clim.2017.04.014
 20. Alexopoulos H, Biba A, Dalakas MC (2016) Anti-B-Cell Therapies in Autoimmune Neurological Diseases: Rationale and Efficacy Trials. *Neurotherapeutics* 13(1):20–33. doi:10.1007/s13311-015-0402-6
 21. Lisak RP, Benjamins JA, Nedelkoska L, Barger JL, Ragheb S, Fan B, Ouamara N, Johnson TA, Rajasekharan S, Bar-Or A (2012) Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J Neuroimmunol* 246(1–2):85–95. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.02.015
 22. Comi G, Bar-Or A, Lassmann H, Uccelli A, Hartung H-P, Montalban X, Sørensen PS, Hohlfeld R, Hauser SL (2021) Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann Neurol* 89(1):13–23. doi:10.1002/ana.25927
 23. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A, Aloisi F (2007) Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204(12):2899–2912. doi:10.1084/jem.20071030
 24. Milo R (2019) Therapies for multiple sclerosis targeting B cells. *Croat Med J* 60(2):87–98. doi:10.3325/cmj.2019.60.87
 25. Baker D, Herrod SS, Alvarez-Gonzalez C, Zalewski L, Albor C, Schmierer K (2017) Both cladribine and alemtuzumab may effect MS via B-cell depletion. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 4(4):e360. doi:10.1212/NXI.0000000000000360
 26. O'Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA (2013) Modelling genetic susceptibility to multiple
-

- sclerosis with family data. *Neuroepidemiology* 40(1):1–12. doi:10.1159/000341902
27. Cree BAC (2014) Multiple sclerosis genetics. *Handb Clin Neurol* 122:193–209. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00009-1
28. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotnik K (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29(1):308–311. doi:10.1093/nar/29.1.308
29. Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234(2):177–186. doi:10.1016/S0378-1119(99)00219-X
30. Arnemann J (2019) Haplotyp. In: Gressner AM, Arndt T (Hrsg.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-48986-4_3495
31. Malhis N, Jones SJM (2010) High quality SNP calling using Illumina data at shallow coverage. *Bioinformatics* 26(8):1029–1035. doi:10.1093/bioinformatics/btq092
32. Vandiedonck C (2018) Genetic association of molecular traits: A help to identify causative variants in complex diseases. *Clin Genet* 93(3):520–532. doi:10.1111/cge.13187
33. James T, Lindén M, Morikawa H, Fernandes SJ, Ruhrmann S, Huss M, Brandi M, Piehl F, Jagodic M, Tegnér J, Khademi M, Olsson T, Gomez-Cabrero D, Kockum I (2018) Impact of genetic risk loci for multiple sclerosis on expression of proximal genes in patients. *Hum Mol Genet* 27(5):912–928. doi:10.1093/hmg/ddy001/4792999
34. The GTEx Consortium (2020) The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science* 369(6509):1318–1330. doi:10.1126/science.aaz1776
35. Andlauer TFM, Buck D, Antony G et al (2016) Novel multiple sclerosis susceptibility loci implicated in epigenetic regulation. *Sci Adv* 2(6):e1501678. doi:10.1126/sciadv.1501678
36. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (2019) Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 365(6460):eaav7188. doi:10.1126/science.aav7188
37. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (2018) Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk. *Cell* 175(6):1679–1687. doi:10.1016/j.cell.2018.09.049
38. Machiela MJ, Chanock SJ (2015) LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics* 31(21):3555–3557. doi:10.1093/bioinformatics/btv402
39. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK et al (2013) Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45(11):1353–1360. doi:10.1038/ng.2770
40. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH et al (2015) Class II HLA interactions modulate genetic risk
-

- for multiple sclerosis. *Nat Genet* 47(10):1107–1113. doi:10.1038/ng.3395
41. Zivković M, Stanković A, Dincić E, Popović M, Popović S, Raicević R, Alavantić D (2009) The tag SNP for HLA-DRB1*1501, rs3135388, is significantly associated with multiple sclerosis susceptibility: cost-effective high-throughput detection by real-time PCR. *Clin Chim Acta* 406(1–2):27–30. doi:10.1016/j.cca.2009.05.004
42. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, Raj T, Gourraud P-A, Stranger BE, Oksenberg J, Olsson T, Taylor BV, Sawcer S, Hafler DA, Carrington M, De Jager PL, De Bakker PIW (2013) Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet* 9(11):e1003926. doi:10.1371/journal.pgen.1003926
43. Patsopoulos NA (2018) Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(7):a028951. doi:10.1101/cshperspect.a028951
44. Attfield KE, Dendrou CA, Fugger L (2012) Bridging the gap from genetic association to functional understanding: the next generation of mouse models of multiple sclerosis. *Immunol Rev* 248(1):10–22. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01132.x
45. Gallagher MD, Chen-Plotkin AS (2018) The Post-GWAS Era: From Association to Function. *Am J Hum Genet* 102(5):717–730. doi:10.1016/j.ajhg.2018.04.002
46. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA et al (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83(3):278–286. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
47. Zettl UK, Stüve O, Patejdl R (2012) Immune-mediated CNS diseases: a review on nosological classification and clinical features. *Autoimmun Rev* 11(3):167–173. doi:10.1016/j.autrev.2011.05.008
48. Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33(11):1444–1452. doi:10.1212/WNL.33.11.1444
49. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA (2018) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 378(2):169–180. doi:10.1056/NEJMra1401483
50. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, Rocca MA (2018) Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 4(1):43. doi:10.1038/s41572-018-0041-4
51. Gyllensten H, Kavaliunas A, Alexanderson K, Hillert J, Tinghög P, Friberg E (2018) Costs and quality of life by disability among people with multiple sclerosis: a register-based study in Sweden. *Mult Scler J Exp Transl Clin* 4(3):1–11. doi:10.1177/2055217318783352
52. Skierlo S, Rommer PS, Zettl UK (2017) Symptomatic treatment in multiple sclerosis-interim analysis of a nationwide registry. *Acta Neurol Scand* 135(4):394–399. doi:10.1111/ane.12612
53. Rommer PS, Eichstädt K, Ellenberger D, Flachenecker P, Friede T, Haas J, Kleinschmitz C, Pöhlau D,
-

- Rienhoff O, Stahmann A, Zettl UK (2019) Symptomatology and symptomatic treatment in multiple sclerosis: Results from a nationwide MS registry. *Mult Scler* 25(12):1641–1652. doi:10.1177/1352458518799580
54. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F et al (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17(2):162–173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
55. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50(1):121–127. doi:10.1002/ana.1032
56. Milo R, Miller A (2014) Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 13(4–5):518–524. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.012
57. Gaitán MI, Correale J (2019) Multiple Sclerosis Misdiagnosis: A Persistent Problem to Solve. *Front Neurol* 10:466. doi:10.3389/fneur.2019.00466
58. Solomon AJ, Bourdette DN, Cross AH, Applebee A, Skidd PM, Howard DB, Spain RI, Cameron MH, Kim E, Mass MK, Yadav V, Whitham RH, Longbrake EE, Naismith RT, Wu GF, Parks BJ, Wingerchuk DM, Rabin BL, Toledano M, Tobin WO, Kantarci OH, Carter JL, Keegan BM, Weinshenker BG (2016) The contemporary spectrum of multiple sclerosis misdiagnosis: A multicenter study. *Neurology* 87(13):1393–1399. doi:10.1212/WNL.0000000000003152
59. Mycko MP, Baranzini SE (2020) microRNA and exosome profiling in multiple sclerosis. *Mult Scler* 26(5):599–604. doi:10.1177/1352458519879303
60. Aktas O (2018) Multiple Sklerose, 7. Aufl. German Medical Collection, Bd 74. Elsevier, München
61. Robertson D, Moreo N (2016) Disease-Modifying Therapies in Multiple Sclerosis: Overview and Treatment Considerations. *Fed Pract* 33(6):28–34
62. Hemmer B, Bayas A, Berthele A et al (2021) Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assozierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie
63. Wiendl H, Gold H, Aktas O et al (im Druck) Positionspapier zur verlaufsmodifizierenden Therapie der Multiplen Sklerose 2021 (White Paper). *Nervenarzt*
64. Klein C, Hohlfeld R, Meier U et al (2020) Empfehlungen zur Therapie der Multiplen Sklerose / Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen für Ärzte, 5. Aufl, in: Krankheitsbezogenes Kompetenznetz Multiple Sklerose e. V. (Hrsg.), Qualitätshandbuch MS / NMOSD
65. Coles AJ, Compston A (2014) Product licences for alemtuzumab and multiple sclerosis. *The*
-

- Lancet 383(9920):867–868. doi:10.1016/S0140-6736(14)60440-2
66. Ocrelizumab for multiple sclerosis (2018). *Drug Ther Bull* 56(7):80–84.
doi:10.1136/dtb.2018.7.0646
67. Cladribine for multiple sclerosis (2018). *Drug Ther Bull* 56(2):21–24.
doi:10.1136/dtb.2018.2.0590
68. Khoy K, Mariotte D, Defer G, Petit G, Toutirais O, Le Mauff B (2020) Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front Immunol* 11:549842.
doi:10.3389/fimmu.2020.549842
69. Lünemann JD, Ruck T, Muraro PA, Bar-Or A, Wiendl H (2020) Immune reconstitution therapies: concepts for durable remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 16(1):56–62.
doi:10.1038/s41582-019-0268-z
70. Finkelsztein A (2014) Multiple sclerosis: overview of disease-modifying agents. *Perspect Medicin Chem* 6:65–72. doi:10.4137/PMC.S13213
71. Thompson SAJ, Jones JL, Cox AL, Compston DAS, Coles AJ (2010) B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 30(1):99–105.
doi:10.1007/s10875-009-9327-3
72. Baker D, Pryce G, Herrod SS, Schmierer K (2019) Potential mechanisms of action related to the efficacy and safety of cladribine. *Mult Scler Relat Disord* 30:176–186.
doi:10.1016/j.msard.2019.02.018
73. Bartel DP (2018) Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173(1):20–51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006
74. Esteller M (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 12(12):861–874.
doi:10.1038/nrg3074
75. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19(1):92–105. doi:10.1101/gr.082701.108
76. Liang H, Huang L, Cao J, Zen K, Chen X, Zhang C-Y (2012) Regulation of mammalian gene expression by exogenous microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3(5):733–742.
doi:10.1002/wrna.1127
77. Kulcheski FR, Christoff AP, Margis R (2016) Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker. *J Biotechnol* 238:42–51. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.09.011
78. Beermann J, Piccoli M-T, Viereck J, Thum T (2016) Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev* 96(4):1297–1325.
doi:10.1152/physrev.00041.2015
79. Lai EC, Wiel C, Rubin GM (2004) Complementary miRNA pairs suggest a regulatory role for miRNA:miRNA duplexes. *RNA* 10(2):171–175. doi:10.1261/rna.5191904
-

80. Liu X, Han Z, Yang C (2017) Associations of microRNA single nucleotide polymorphisms and disease risk and pathophysiology. *Clin Genet* 92(3):235–242. doi:10.1111/cge.12950
 81. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D155–D162. doi:10.1093/nar/gky1141
 82. Iwama H, Kato K, Imachi H, Murao K, Masaki T (2013) Human microRNAs originated from two periods at accelerated rates in mammalian evolution. *Mol Biol Evol* 30(3):613–626. doi:10.1093/molbev/mss262
 83. Boivin V, Deschamps-Francoeur G, Scott MS (2018) Protein coding genes as hosts for noncoding RNA expression. *Semin Cell Dev Biol* 75:3–12. doi:10.1016/j.semcdb.2017.08.016
 84. Treiber T, Treiber N, Meister G (2019) Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(1):5–20. doi:10.1038/s41580-018-0059-1
 85. Conrad T, Marsico A, Gehre M, Orom UA (2014) Microprocessor activity controls differential miRNA biogenesis In Vivo. *Cell Rep* 9(2):542–554. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.007
 86. Hecker M, Boxberger N, Illner N, Fitzner B, Schröder I, Winkelmann A, Dudesek A, Meister S, Koczan D, Lorenz P, Thiesen H-J, Zettl UK (2019) A genetic variant associated with multiple sclerosis inversely affects the expression of CD58 and microRNA-548ac from the same gene. *PLoS Genet* 15(2):e1007961. doi:10.1371/journal.pgen.1007961
 87. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C (2018) Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* 9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402
 88. Creugny A, Fender A, Pfeffer S (2018) Regulation of primary microRNA processing. *FEBS Lett* 592(12):1980–1996. doi:10.1002/1873-3468.13067
 89. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10(12):1957–1966. doi:10.1261/rna.7135204
 90. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425(6956):415–419. doi:10.1038/nature01957
 91. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303(5654):95–98. doi:10.1126/science.1090599
 92. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436(7051):740–744. doi:10.1038/nature03868
 93. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell*
-

- 39(2):292–299. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.015
94. Kawamata T, Tomari Y (2010) Making RISC. *Trends Biochem Sci* 35(7):368–376. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.009
95. Frank F, Sonenberg N, Nagar B (2010) Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465(7299):818–822. doi:10.1038/nature09039
96. Suzuki HI, Katsura A, Yasuda T, Ueno T, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K (2015) Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nat Struct Mol Biol* 22(7):512–521. doi:10.1038/nsmb.3050
97. Ameres SL, Zamore PD (2013) Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(8):475–488. doi:10.1038/nrm3611
98. Cloonan N, Wani S, Xu Q, Gu J, Lea K, Heater S, Barbacioru C, Steptoe AL, Martin HC, Nourbakhsh E, Krishnan K, Gardiner B, Wang X, Nones K, Steen JA, Matigian NA, Wood DL, Kassahn KS, Waddell N, Shepherd J, Lee C, Ichikawa J, McKernan K, Bramlett K, Kuersten S, Grimmond SM (2011) MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biol* 12(12):R126. doi:10.1186/gb-2011-12-12-r126
99. Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Blelloch R, Schroth GP, Nusbaum C, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev* 24(10):992–1009. doi:10.1101/gad.1884710
100. Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(8):509–524. doi:10.1038/nrm3838
101. Westholm JO, Lai EC (2011) Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 93(11):1897–1904. doi:10.1016/j.biochi.2011.06.017
102. Feng Y, Zhang X, Song Q, Li T, Zeng Y (2011) Drosha processing controls the specificity and efficiency of global microRNA expression. *Biochim Biophys Acta* 1809(11-12):700–707. doi:10.1016/j.bbaprm.2011.05.015
103. Fang W, Bartel DP (2015) The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes. *Mol Cell* 60(1):131–145. doi:10.1016/j.molcel.2015.08.015
104. Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2005) Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 24(1):138–148. doi:10.1038/sj.emboj.7600491
105. Zeng Y, Cullen BR (2005) Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* 280(30):27595–27603. doi:10.1074/jbc.M504714200
106. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang B-T, Kim VN (2006)
-

- Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125(5):887–901. doi:10.1016/j.cell.2006.03.043
107. Nguyen TA, Jo MH, Choi Y-G, Park J, Kwon SC, Hohng S, Kim VN, Woo J-S (2015) Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* 161(6):1374–1387. doi:10.1016/j.cell.2015.05.010
108. Auyeung VC, Ulitsky I, McGeary SE, Bartel DP (2013) Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell* 152(4):844–858. doi:10.1016/j.cell.2013.01.031
109. Quick-Cleveland J, Jacob JP, Weitz SH, Shoffner G, Senturia R, Guo F (2014) The DGCR8 RNA-binding heme domain recognizes primary microRNAs by clamping the hairpin. *Cell Rep* 7(6):1994–2005. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.013
110. Ma H, Wu Y, Choi J-G, Wu H (2013) Lower and upper stem-single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(51):20687–20692. doi:10.1073/pnas.1311639110
111. Mori M, Triboulet R, Mohseni M, Schlegelmilch K, Shrestha K, Camargo FD, Gregory RI (2014) Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent miRNA biogenesis to cancer. *Cell* 156(5):893–906. doi:10.1016/j.cell.2013.12.043
112. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215–233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
113. Chen C-YA, Shyu A-B (2011) Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2(2):167–183. doi:10.1002/wrna.40
114. Chu C, Rana TM (2006) Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* 4(7):e210. doi:10.1371/journal.pbio.0040210.
115. Djuranovic S, Nahvi A, Green R (2012) miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336(6078):237–240. doi:10.1126/science.1215691
116. Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, Hsu S-H, Ghoshal K, Villén J, Bartel DP (2014) mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell* 56(1):104–115. doi:10.1016/j.molcel.2014.08.028
117. Jonas S, De Izaurrealde E (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 16(7):421–433. doi:10.1038/nrg3965
118. Huang H-Y, Lin Y-C-D, Li J et al (2020) miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic Acids Res* 48(D1):D148–D154. doi:10.1093/nar/gkz896
119. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N (2018) miRWALK: An online resource for prediction of
-

- microRNA binding sites. *PLoS ONE* 13(10):e0206239. doi:10.1371/journal.pone.0206239
120. Park JH, Shin S-Y, Shin C (2017) Non-canonical targets destabilize microRNAs in human Argonautes. *Nucleic Acids Res* 45(4):1569–1583. doi:10.1093/nar/gkx029
121. Keller A, Leidinger P, Lange J, Borries A, Schroers H, Scheffler M, Lenhof H-P, Ruprecht K, Meese E (2009) Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS ONE* 4(10):e7440. doi:10.1371/journal.pone.0007440
122. Martinez B, Peplow PV (2020) MicroRNAs in blood and cerebrospinal fluid as diagnostic biomarkers of multiple sclerosis and to monitor disease progression. *Neural Regen Res* 15(4):606–619. doi:10.4103/1673-5374.266905
123. Thamilarasan M, Koczan D, Hecker M, Paap B, Zettl UK (2012) MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmun Rev* 11(3):174–179. doi:10.1016/j.autrev.2011.05.009
124. Nuzziello N, Ciaccia L, Liguori M (2019) Precision Medicine in Neurodegenerative Diseases: Some Promising Tips Coming from the microRNAs' World. *Cells* 9(1):75. doi:10.3390/cells9010075
125. Mohammed EM (2020) Environmental Influencers, MicroRNA, and Multiple Sclerosis. *J Cent Nerv Syst Dis* 12:1–32. doi:10.1177/1179573519894955
126. Huang Q, Xiao B, Ma X, Qu M, Li Y, Nagarkatti P, Nagarkatti M, Zhou J (2016) MicroRNAs associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 295–296:148–161. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.04.014
127. Freiesleben S, Hecker M, Zettl UK, Fuellen G, Taher L (2016) Analysis of microRNA and Gene Expression Profiles in Multiple Sclerosis: Integrating Interaction Data to Uncover Regulatory Mechanisms. *Sci Rep* 6:34512. doi:10.1038/srep34512
128. Boxberger N, Hecker M, Zettl UK (2019) Dysregulation of Inflammasome Priming and Activation by MicroRNAs in Human Immune-Mediated Diseases. *J Immunol* 202(8):2177–2187. doi:10.4049/jimmunol.1801416
129. Hecker M, Thamilarasan M, Koczan D, Schröder I, Flechtner K, Freiesleben S, Füllen G, Thiesen H-J, Zettl UK (2013) MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci* 14(8):16087–16110. doi:10.3390/ijms140816087
130. Friess J, Hecker M, Roch L, Koczan D, Fitzner B, Angerer IC, Schröder I, Flechtner K, Thiesen H-J, Winkelmann A, Zettl UK (2017) Fingolimod alters the transcriptome profile of circulating CD4+ cells in multiple sclerosis. *Sci Rep* 7:42087. doi:10.1038/srep42087
131. Fenoglio C, Cantoni C, De Riz M, Ridolfi E, Cortini F, Serpente M, Villa C, Comi C, Monaco F,
-

- Mellesi L, Valzelli S, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E (2011) Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 504(1):9–12. doi:10.1016/j.neulet.2011.08.021
132. Waschbisch A, Atiya M, Linker RA, Potapov S, Schwab S, Derfuss T (2011) Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *PLoS ONE* 6(9):e24604. doi:10.1371/journal.pone.0024604
133. Ingwersen J, Menge T, Wingerath B, Kaya D, Graf J, Prozorovski T, Keller A, Backes C, Beier M, Scheffler M, Dehmel T, Kieseier BC, Hartung H-P, Küry P, Aktas O (2015) Natalizumab restores aberrant miRNA expression profile in multiple sclerosis and reveals a critical role for miR-20b. *Ann Clin Transl Neurol* 2(1):43–55. doi:10.1002/acn3.152
134. Meira M, Sievers C, Hoffmann F, Rasenack M, Kuhle J, Derfuss T, Kappos L, Lindberg RLP (2014) Unraveling natalizumab effects on deregulated miR-17 expression in CD4+ T cells of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol Res* 2014:897249. doi:10.1155/2014/897249
135. Gandhi R, Healy B, Gholipour T, Egorova S, Musallam A, Hussain MS, Nejad P, Patel B, Hei H, Khoury S, Quintana F, Kivisakk P, Chitnis T, Weiner HL (2013) Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 73(6):729–740. doi:10.1002/ana.23880
136. Regev K, Healy BC, Paul A, Diaz-Cruz C, Mazzola MA, Raheja R, Glanz BI, Kivisäkk P, Chitnis T, Jagodic M, Piehl F, Olsson T, Khademi M, Hauser S, Oksenberg J, Khoury SJ, Weiner HL, Gandhi R (2018) Identification of MS-specific serum miRNAs in an international multicenter study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 5(5):e491. doi:10.1212/NXI.000000000000491
137. Godshalk SE, Bhaduri-McIntosh S, Slack FJ (2008) Epstein-Barr virus-mediated dysregulation of human microRNA expression. *Cell Cycle* 7(22):3595–3600. doi:10.4161/cc.7.22.7120
138. Forte E, Luftig MA (2011) The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes Infect* 13(14–15):1156–1167. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.007
139. Hassani A, Khan G (2019) Epstein-Barr Virus and miRNAs: Partners in Crime in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis? *Front Immunol* 10:695. doi:10.3389/fimmu.2019.00695
140. Willinger CM, Rong J, Tanriverdi K, Courchesne PL, Huan T, Wasserman GA, Lin H, Dupuis J, Joehanes R, Jones MR, Chen G, Benjamin EJ, O'Connor GT, Mizgerd JP, Freedman JE, Larson MG, Levy D (2017) MicroRNA Signature of Cigarette Smoking and Evidence for a Putative Causal Role of MicroRNAs in Smoking-Related Inflammation and Target Organ Damage. *Circ Cardiovasc Genet* 10(5):e001678. doi:10.1161/CIRCGENETICS.116.001678
141. Huan T, Rong J, Liu C, Zhang X, Tanriverdi K, Joehanes R, Chen BH, Murabito JM, Yao C,
-

- Courchesne P, Munson PJ, O'Donnell CJ, Cox N, Johnson AD, Larson MG, Levy D, Freedman JE (2015) Genome-wide identification of microRNA expression quantitative trait loci. *Nat Commun* 6:6601. doi:10.1038/ncomms7601
142. Lappalainen T, Sammeth M, Friedländer MR et al (2013) Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature* 501(7468):506–511. doi:10.1038/nature12531
143. Li Y, Du C, Wang W, Ma G, Cui L, Zhou H, Tao H, Yao L, Zhao B, Li K (2015) Genetic association of MiR-146a with multiple sclerosis susceptibility in the Chinese population. *Cell Physiol Biochem* 35(1):281–291. doi:10.1159/000369695
144. Hecker M, Fitzner B, Blaschke J, Blaschke P, Zettl UK (2015) Susceptibility variants in the CD58 gene locus point to a role of microRNA-548ac in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mutat Res Rev Mutat Res* 763:161–167. doi:10.1016/j.mrrev.2014.10.002
145. Steri M, Orrù V, Idda ML et al (2017) Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *N Engl J Med* 376(17):1615–1626. doi:10.1056/NEJMoa1610528
146. Zhang Y, Xu B, Yang Y, Ban R, Zhang H, Jiang X, Cooke HJ, Xue Y, Shi Q (2012) CPSS: a computational platform for the analysis of small RNA deep sequencing data. *Bioinformatics* 28(14):1925–1927. doi:10.1093/bioinformatics/bts282
147. Zhang Y, Zang Q, Xu B, Zheng W, Ban R, Zhang H, Yang Y, Hao Q, Iqbal F, Li A, Shi Q (2016) IsomiR Bank: a research resource for tracking IsomiRs. *Bioinformatics* 32(13):2069–2071. doi:10.1093/bioinformatics/btw070
148. Slatkin M (2008) Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* 9(6):477–485. doi:10.1038/nrg2361
149. Zhong X, Heinicke F, Rayner S (2019) miRBaseMiner, a tool for investigating miRBase content. *RNA Biol* 16(11):1534–1546. doi:10.1080/15476286.2019.1637680
150. Backes C, Fehlmann T, Kern F, Kehl T, Lenhof H-P, Meese E, Keller A (2018) miRCarta: a central repository for collecting miRNA candidates. *Nucleic Acids Res* 46(D1):D160–D167. doi:10.1093/nar/gkx851
151. Lorenz R, Bernhart SH, Höner Zu Siederdissen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol* 6:26. doi:10.1186/1748-7188-6-26
152. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12(6):996–1006. doi:10.1101/gr.229102
153. Allegra D, Mertens D (2011) In-vivo quantification of primary microRNA processing by Drosha with a luciferase based system. *Biochem Biophys Res Commun* 406(4):501–505. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.055
154. Bilan V, Allegra D, Kuchenbauer F, Mertens D (2014) In vivo processing assay based on a dual-
-

- luciferase reporter system to evaluate DROSHA enzymatic activity. *Methods Mol Biol* 1095:87–93. doi:10.1007/978-1-62703-703-7_6
155. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3. doi:10.1186/1471-2199-7-3
156. Peltier HJ, Latham GJ (2008) Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 14(5):844–852. doi:10.1261/rna.939908
157. Bargaje R, Hariharan M, Scaria V, Pillai B (2010) Consensus miRNA expression profiles derived from interplatform normalization of microarray data. *RNA* 16(1):16–25. doi:10.1261/rna.1688110
158. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33(20):e179. doi:10.1093/nar/gni178
159. Ritchie ME, Phipson B, Di Wu, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43(7):e47. doi:10.1093/nar/gkv007
160. Krüger J, Rehmsmeier M (2006) RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue):W451–W454. doi:10.1093/nar/gkl243
161. Kinsella RJ, Kähäri A, Haider S, Zamora J, Proctor G, Spudich G, Almeida-King J, Staines D, Derwent P, Kerhornou A, Kersey P, Flieck P (2011) Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. *Database (Oxf)* 2011:bar030. doi:10.1093/database/bar030
162. Fabregat A, Sidiropoulos K, Viteri G, Forner O, Marin-Garcia P, Arnau V, D'Eustachio P, Stein L, Hermjakob H (2017) Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach. *BMC Bioinformatics* 18(1):142. doi:10.1186/s12859-017-1559-2
163. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, Clark NR, Ma'ayan A (2013) Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14:128. doi:10.1186/1471-2105-14-128
164. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44(W1):W90–W97. doi:10.1093/nar/gkw377
165. Amberger JS, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A (2019) OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D1038–D1043.

doi:10.1093/nar/gky1151

166. van Gassen S, Gaudilliere B, Angst MS, Saeys Y, Aghaeepour N (2020) CytoNorm: A Normalization Algorithm for Cytometry Data. *Cytometry A* 97(3):268–278. doi:10.1002/cyto.a.23904
167. Monaco G, Chen H, Poidinger M, Chen J, De Magalhães JP, Larbi A (2016) flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data. *Bioinformatics* 32(16):2473–2480. doi:10.1093/bioinformatics/btw191
168. Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A et al (2017) Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol* 47(10):1584–1797. doi:10.1002/eji.201646632
169. Bonnefoy J (1995) CD23 and B-cell activation. *Current Opinion in Immunology* 7(3):355–359. doi:10.1016/0952-7915(95)80110-3
170. Yap H-Y, Siow T-S, Chow S-K, Teow S-Y (2019) Epstein-Barr Virus- (EBV-) Immortalized Lymphoblastoid Cell Lines (LCLs) Express High Level of CD23 but Low CD27 to Support Their Growth. *Adv Virol* 2019:6464521. doi:10.1155/2019/6464521
171. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ (2010) Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* 162(2):271–279. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04206.x
172. Fox J, Weisberg S, Price B, Adler D, Bates D, Baud-Bovy G, Bolker B, Ellison S, Firth D, Friendly M, Gorjanc G, Graves S, Heiberger R, Krivitsky P, Laboissiere R, Maechler M, Monette G, Murdoch D, Nilsson H, Ogle D, Ripley B, Venables W, Walker S, Winsemius D, Zeileis A, R-Cores (2016) Package ‘Car’. <http://cran-r.project.org/web/packages/car/car.pdf>
173. Hothorn T, Bretz F, Westfall P, Heiberger RM, Schuetzenmeister A, Scheibe S (2021) Package ‘multcomp’. <https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/multcomp.pdf>
174. Forero DA, González-Giraldo Y, Castro-Vega LJ, Barreto GE (2019) qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *BioTechniques* 67(4):192–199. doi:10.2144/btn-2019-0065
175. Kramer MF (2011) Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol Kapitel 15:Unit 15.10.* doi:10.1002/0471142727.mb1510s95
176. McCall MN, McMurray HR, Land H, Almudevar A (2014) On non-detects in qPCR data. *Bioinformatics* 30(16):2310–2316. doi:10.1093/bioinformatics/btu239
177. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2014) Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. arxiv:arXiv:1406.5823
178. Wall JD, Pritchard JK (2003) Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 4(8):587–597. doi:10.1038/nrg1123
179. Shifman S, Kuypers J, Kokoris M, Yakir B, Darvasi A (2003) Linkage disequilibrium patterns of the
-

- human genome across populations. *Hum Mol Genet* 12(7):771–776. doi:10.1093/hmg/ddg088
- 180.Ricaño-Ponce I, Zhernakova DV, Deelen P, Luo O, Li X, Isaacs A, Karjalainen J, Di Tommaso J, Borek ZA, Zorro MM, Gutierrez-Achury J, Uitterlinden AG, Hofman A, van Meurs J, Netea MG, Jonkers IH, Withoff S, van Duijn CM, Li Y, Ruan Y, Franke L, Wijmenga C, Kumar V (2016) Refined mapping of autoimmune disease associated genetic variants with gene expression suggests an important role for non-coding RNAs. *J Autoimmun* 68:62–74. doi:10.1016/j.jaut.2016.01.002
- 181.Li S, Nguyen TD, Nguyen TL, Nguyen TA (2020) Mismatched and wobble base pairs govern primary microRNA processing by human Microprocessor. *Nat Commun* 11(1):1926. doi:10.1038/s41467-020-15674-2
- 182.Li S, Le TN-Y, Nguyen TD, Trinh TA, Nguyen TA (2021) Bulges control pri-miRNA processing in a position and strand-dependent manner. *RNA Biol* 2021:1–11. doi:10.1080/15476286.2020.1868139
- 183.De Rie D, Abugessaisa I, Alam T et al (2017) An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol* 35(9):872–878. doi:10.1038/nbt.3947
- 184.Li X, Pan X, Fu X, Yang Y, Chen J, Lin W (2019) MicroRNA-26a: An Emerging Regulator of Renal Biology and Disease. *Kidney Blood Press Res* 44(3):287–297. doi:10.1159/000499646
- 185.Wang Q, Ye B, Wang P, Yao F, Zhang C, Yu G (2019) Overview of microRNA-199a Regulation in Cancer. *Cancer Manag Res* 11:10327–10335. doi:10.2147/CMAR.S231971
- 186.Gu S, Chan W-Y (2012) Flexible and versatile as a chameleon-sophisticated functions of microRNA-199a. *Int J Mol Sci* 13(7):8449–8466. doi:10.3390/ijms13078449
- 187.Jima DD, Zhang J, Jacobs C et al (2010) Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood* 116(23):e118–e127. doi:10.1182/blood-2010-05-285403
- 188.Piriayapongsa J, Jordan IK (2007) A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements. *PLoS ONE* 2(2):e203. doi:10.1371/journal.pone.0000203
- 189.Wei G, Zhang T, Li Z, Yu N, Xue X, Zhou D, Chen Y, Zhang L, Yao X, Ji G (2020) USF1-mediated upregulation of lncRNA GAS6-AS2 facilitates osteosarcoma progression through miR-934/BCAT1 axis. *Aging (Albany NY)* 12(7):6172–6190. doi:10.18632/aging.103015
- 190.Hu Y, Zhang Q, Cui J, Liao Z-J, Jiao M, Zhang Y-B, Guo Y-H, Gao Y-M (2019) Oncogene miR-934 promotes ovarian cancer cell proliferation and inhibits cell apoptosis through targeting BRMS1L. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23(13):5595–5602. doi:10.26355/eurrev_201907_18293
- 191.Jin Y, Weng Y, Wang Y, Lin J, Deng X, Shen B, Zhan Q, Lu X (2020) miR-934 as a Prognostic Marker Facilitates Cell Proliferation and Migration of Pancreatic Tumor by Targeting PROX1. *Oncotargets Ther* 13:3389–3399. doi:10.2147/OTT.S249662

- 192.Zhao S, Mi Y, Guan B, Zheng B, Wei P, Gu Y, Zhang Z, Cai S, Xu Y, Li X, He X, Zhong X, Li G, Chen Z, Li D (2020) Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer. *J Hematol Oncol* 13(1):156. doi:10.1186/s13045-020-00991-2
- 193.Yan H, Ren S, Lin Q, Yu Y, Chen C, Hua X, Jin H, Lu Y, Zhang H, Xie Q, Huang C, Huang H (2019) Inhibition of UBE2N-dependent CDK6 protein degradation by miR-934 promotes human bladder cancer cell growth. *FASEB J* 33(11):12112–12123. doi:10.1096/fj.201900499RR
- 194.Prodromidou K, Vlachos IS, Gaitanou M, Kouroupi G, Hatzigeorgiou AG, Matsas R (2020) MicroRNA-934 is a novel primate-specific small non-coding RNA with neurogenic function during early development. *eLife* 9:e50561. doi:10.7554/eLife.50561
- 195.Wang J, Li Z, Liu B, Chen G, Shao N, Ying X, Wang Y (2016) Systematic study of cis-antisense miRNAs in animal species reveals miR-3661 to target PPP2CA in human cells. *RNA* 22(1):87–95. doi:10.1261/rna.052894.115
- 196.Shi L, Lin Y-H, Sierant MC, Zhu F, Cui S, Guan Y, Sartor MA, Tanabe O, Lim K-C, Engel JD (2014) Developmental transcriptome analysis of human erythropoiesis. *Hum Mol Genet* 23(17):4528–4542. doi:10.1093/hmg/ddu167
- 197.Chen M, Xu R, Ji H, Greening DW, Rai A, Izumikawa K, Ishikawa H, Takahashi N, Simpson RJ (2016) Transcriptome and long noncoding RNA sequencing of three extracellular vesicle subtypes released from the human colon cancer LIM1863 cell line. *Sci Rep* 6:38397. doi:10.1038/srep38397
- 198.Abba MC, Gong T, Lu Y, Lee J, Zhong Y, Lacunza E, Butti M, Takata Y, Gaddis S, Shen J, Estecio MR, Sahin AA, Aldaz CM (2015) A Molecular Portrait of High-Grade Ductal Carcinoma In Situ. *Cancer Res* 75(18):3980–3990. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0506
- 199.Qiu L, Liu X (2019) Identification of key genes involved in myocardial infarction. *Eur J Med Res* 24(1):22. doi:10.1186/s40001-019-0381-x
- 200.Benezeder T, Painsi C, Patra V, Dey S, Holcmann M, Lange-Asschenfeldt B, Sibilia M, Wolf P (2020) Dithranol targets keratinocytes, their crosstalk with neutrophils and inhibits the IL-36 inflammatory loop in psoriasis. *eLife* 9:e56991. doi:10.7554/eLife.56991
- 201.Törmä H, Bergström A, Ghiasifarhani G, Berne B (2014) The effect of two endogenous retinoids on the mRNA expression profile in human primary keratinocytes, focusing on genes causing autosomal recessive congenital ichthyosis. *Arch Dermatol Res* 306(8):739–747. doi:10.1007/s00403-014-1476-4
- 202.Hicks SD, Jacob P, Middleton FA, Perez O, Gagnon Z (2018) Distance running alters peripheral microRNAs implicated in metabolism, fluid balance, and myosin regulation in a sex-specific
-

- manner. *Physiol Genomics* 50(8):658–667. doi:10.1152/physiolgenomics.00035.2018
203. Wang Q, Xie X, Li H, Hao S (2020) Discovery of microRNA expression profiles involved in regulating TGF- β 2 expression in the tears of dry eye patients. *Ann Clin Biochem* 57(6):420–428. doi:10.1177/0004563220961746
204. Prašnikar E, Kunej T, Knez J, Repnik K, Potočnik U, Kovačič B (2020) Determining the Molecular Background of Endometrial Receptivity in Adenomyosis. *Biomolecules* 10(9):1311. doi:10.3390/biom10091311
205. Chen Z, Huang J, Feng Y, Li Z, Jiang Y (2021) Profiling of specific long non-coding RNA signatures identifies ST8SIA6-AS1 AS a novel target for breast cancer. *J Gene Med* 23(2):e3286. doi:10.1002/jgm.3286
206. Yang B, Jing C, Wang J, Guo X, Chen Y, Xu R, Peng L, Liu J, Li L (2014) Identification of microRNAs associated with lymphangiogenesis in human gastric cancer. *Clin Transl Oncol* 16(4):374–379. doi:10.1007/s12094-013-1081-6
207. Pouget JG, Han B, Wu Y, Mignot E, Ollila HM, Barker J, Spain S, Dand N, Trembath R, Martin J, Mayes MD, Bossini-Castillo L, López-Isac E, Jin Y, Santorico SA, Spritz RA, Hakonarson H, Polychronakos C, Raychaudhuri S, Knight J (2019) Cross-disorder analysis of schizophrenia and 19 immune-mediated diseases identifies shared genetic risk. *Hum Mol Genet* 28(20):3498–3513. doi:10.1093/hmg/ddz145
208. Le Hellard S, Wang Y, Witoelar A, Zuber V, Bettella F, Hugdahl K, Espeseth T, Steen VM, Melle I, Desikan R, Schork AJ, Thompson WK, Dale AM, Djurovic S, Andreassen OA (2017) Identification of Gene Loci That Overlap Between Schizophrenia and Educational Attainment. *Schizophr Bull* 43(3):654–664. doi:10.1093/schbul/sbw085
209. Bulayeva K, Lesch K-P, Bulayev O, Walsh C, Glatt S, Gurgenova F, Omarova J, Berdichevets I, Thompson PM (2015) Genomic structural variants are linked with intellectual disability. *J Neural Transm (Vienna)* 122(9):1289–1301. doi:10.1007/s00702-015-1366-8
210. Perdomo C, Campbell JD, Gerrein J, Tellez CS, Garrison CB, Walser TC, Drzik E, Si H, Gower AC, Vick J, Anderlind C, Jackson GR, Mankus C, Schembri F, O'Hara C, Gomperts BN, Dubinett SM, Hayden P, Belinsky SA, Lenburg ME, Spira A (2013) MicroRNA 4423 is a primate-specific regulator of airway epithelial cell differentiation and lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(47):18946–18951. doi:10.1073/pnas.1220319110
211. Fan J, Feng Y, Zhang R, Zhang W, Shu Y, Zeng Z, Huang S, Zhang L, Huang B, Di Wu, Zhang B, Wang X, Lei Y, Ye Z, Zhao L, Cao D, Yang L, Chen X, Liu B, Wagstaff W, He F, Wu X, Zhang J, Moriatis Wolf J, Lee MJ, Haydon RC, Luu HH, Huang A, He T-C, Yan S (2020) A simplified system for the effective expression and delivery of functional mature microRNAs in mammalian cells.

- Cancer Gene Ther 27(6):424–437. doi:10.1038/s41417-019-0113-y
- 212.Faller M, Toso D, Matsunaga M, Atanasov I, Senturia R, Chen Y, Zhou ZH, Guo F (2010) DGCR8 recognizes primary transcripts of microRNAs through highly cooperative binding and formation of higher-order structures. *RNA* 16(8):1570–1583. doi:10.1261/rna.2111310
- 213.Fairfax BP, Makino S, Radhakrishnan J, Plant K, Leslie S, Dilthey A, Ellis P, Langford C, Vannberg FO, Knight JC (2012) Genetics of gene expression in primary immune cells identifies cell type-specific master regulators and roles of HLA alleles. *Nat Genet* 44(5):502–510. doi:10.1038/ng.2205
- 214.Jin HY, Gonzalez-Martin A, Miletic AV, Lai M, Knight S, Sabouri-Ghomi M, Head SR, Macauley MS, Rickert RC, Xiao C (2015) Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Front Genet* 6:340. doi:10.3389/fgene.2015.00340
- 215.Mohr AM, Mott JL (2015) Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 35(1):3–11. doi:10.1055/s-0034-1397344
- 216.Thul PJ, Lindskog C (2018) The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Sci* 27(1):233–244. doi:10.1002/pro.3307
- 217.Franz M, Rodriguez H, Lopes C, Zuberi K, Montojo J, Bader GD, Morris Q (2018) GeneMANIA update 2018. *Nucleic Acids Res* 46(W1):W60-W64. doi:10.1093/nar/gky311
- 218.Angerstein C, Hecker M, Paap BK, Koczan D, Thamilarasan M, Thiesen H-J, Zettl UK (2012) Integration of MicroRNA databases to study MicroRNAs associated with multiple sclerosis. *Mol Neurobiol* 45(3):520–535. doi:10.1007/s12035-012-8270-0
- 219.Yue D, Liu H, Huang Y (2009) Survey of Computational Algorithms for MicroRNA Target Prediction. *Curr Genomics* 10(7):478–492. doi:10.2174/138920209789208219
- 220.Brümmer A, Hausser J (2014) MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *Bioessays* 36(6):617–626. doi:10.1002/bies.201300104
- 221.Wang Z, Xu W, Liu Y (2015) Integrating full spectrum of sequence features into predicting functional microRNA-mRNA interactions. *Bioinformatics* 31(21):3529–3536. doi:10.1093/bioinformatics/btv392
- 222.Fridrich A, Hazan Y, Moran Y (2019) Too Many False Targets for MicroRNAs: Challenges and Pitfalls in Prediction of miRNA Targets and Their Gene Ontology in Model and Non-model Organisms. *Bioessays* 41(4):e1800169. doi:10.1002/bies.201800169
- 223.Lee SY, Choi JE, Jeon HS, Hong MJ, Choi YY, Kang HG, Yoo SS, Lee EB, Jeong JY, Lee WK, Lee J, Cha SI, Kim CH, Kim YT, Jheon S, Son JW, Park JY (2015) A genetic variation in microRNA target site of KRT81 gene is associated with survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*
-

- 26(6):1142–1148. doi:10.1093/annonc/mdv100
224. Lau H-K, Wu E-R, Chen M-K, Hsieh M-J, Yang S-F, Wang L-Y, Chou Y-E (2017) Effect of genetic variation in microRNA binding site in WNT1-inducible signaling pathway protein 1 gene on oral squamous cell carcinoma susceptibility. *PLoS ONE* 12(4):e0176246. doi:10.1371/journal.pone.0176246
225. Althouse AD (2016) Adjust for Multiple Comparisons? It's Not That Simple. *Ann Thorac Surg* 101(5):1644–1645. doi:10.1016/j.athoracsur.2015.11.024
226. Pinciotti CM, Riemann BC, Wetterneck CT (2021) Trauma type and obsessive-compulsive symptom domains: The unique relationship between indirectly experienced trauma and just right symptoms. *Journal of Obsessive-Compulsive and Related Disorders* 29:100624. doi:10.1016/j.jocrd.2021.100624
227. Negron A, Robinson RR, Stüve O, Forsthuber TG (2019) The role of B cells in multiple sclerosis: Current and future therapies. *Cell Immunol* 339:10–23. doi:10.1016/j.cellimm.2018.10.006
228. Sorensen PS, Sellebjerg F (2019) Pulsed immune reconstitution therapy in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 12:1–12. doi:10.1177/1756286419836913
229. Baker D, Herrod SS, Alvarez-Gonzalez C, Giovannoni G, Schmierer K (2017) Interpreting Lymphocyte Reconstitution Data From the Pivotal Phase 3 Trials of Alemtuzumab. *JAMA Neurol* 74(8):961–969. doi:10.1001/jamaneurol.2017.0676
230. Ceronie B, Jacobs BM, Baker D, Dubuisson N, Mao Z, Ammoscato F, Lock H, Longhurst HJ, Giovannoni G, Schmierer K (2018) Cladribine treatment of multiple sclerosis is associated with depletion of memory B cells. *J Neurol* 265(5):1199–1209. doi:10.1007/s00415-018-8830-y
231. Planas R, Jelčić I, Schippling S, Martin R, Sospedra M (2012) Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 42(3):790–798. doi:10.1002/eji.201142108
232. Traub JW, Pellkofer HL, Grondel K, Seeger I, Rowold C, Brück W, Husseini L, Häusser-Kinzel S, Weber MS (2019) Natalizumab promotes activation and pro-inflammatory differentiation of peripheral B cells in multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation* 16(1):228. doi:10.1186/s12974-019-1593-2
233. Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K (2017) Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis. *EBioMedicine* 16:41–50. doi:10.1016/j.ebiom.2017.01.042
234. Megyola C, Ye J, Bhaduri-McIntosh S (2011) Identification of a sub-population of B cells that proliferates after infection with Epstein-Barr virus. *Virol J* 8:84. doi:10.1186/1743-422X-8-84
235. Wu H, Ye C, Ramirez D, Manjunath N (2009) Alternative processing of primary microRNA
-

- transcripts by Drosha generates 5' end variation of mature microRNA. *PLoS ONE* 4(10):e7566. doi:10.1371/journal.pone.0007566
236. Dhanoa JK, Verma R, Sethi RS, Arora JS, Mukhopadhyay CS (2019) Biogenesis and biological implications of isomiRs in mammals- a review. *ExRNA* 1:3. doi:10.1186/s41544-018-0003-8
237. Nejad C, Pépin G, Behlke MA, Gantier MP (2018) Modified Polyadenylation-Based RT-qPCR Increases Selectivity of Amplification of 3'-MicroRNA Isoforms. *Front Genet* 9:11. doi:10.3389/fgene.2018.00011
238. Schamberger A, Orbán TI (2014) 3' IsomiR species and DNA contamination influence reliable quantification of microRNAs by stem-loop quantitative PCR. *PLoS ONE* 9(8):e106315. doi:10.1371/journal.pone.0106315
239. Halushka MK, Fromm B, Peterson KJ, McCall MN (2018) Big Strides in Cellular MicroRNA Expression. *Trends Genet* 34(3):165–167. doi:10.1016/j.tig.2017.12.015
240. Rossmanith P, Wagner M (2011) A novel poisson distribution-based approach for testing boundaries of real-time PCR assays for food pathogen quantification. *J Food Prot* 74(9):1404–1412. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-458
241. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögren B, Linz L, Kubista M (2017) Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif* 12:1–6. doi:10.1016/j.bdq.2017.04.001
242. Honda S, Kirino Y (2015) Dumbbell-PCR: a method to quantify specific small RNA variants with a single nucleotide resolution at terminal sequences. *Nucleic Acids Res* 43(12):e77. doi:10.1093/nar/gkv218
243. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Galichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M (2013) Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods* 10(10):1003–1005. doi:10.1038/nmeth.2633
244. Huggett JF, Cowen S, Foy CA (2015) Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem* 61(1):79–88. doi:10.1373/clinchem.2014.221366
245. Vistbakka J, Elovaara I, Lehtimäki T, Hagman S (2017) Circulating microRNAs as biomarkers in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 23(3):403–412. doi:10.1177/1352458516651141
246. Honardoost MA, Kiani-Esfahani A, Ghaedi K, Etemadifar M, Salehi M (2014) miR-326 and miR-26a, two potential markers for diagnosis of relapse and remission phases in patient with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Gene* 544(2):128–133. doi:10.1016/j.gene.2014.04.069
247. Mameli G, Arru G, Caggiu E, Niegowska M, Leoni S, Madeddu G, Babudieri S, Sechi GP, Sechi LA (2016) Natalizumab Therapy Modulates miR-155, miR-26a and Proinflammatory Cytokine Expression in MS Patients. *PLoS ONE* 11(6):e0157153. doi:10.1371/journal.pone.0157153
-

248. De Felice B, Mondola P, Sasso A, Orefice G, Bresciamorra V, Vacca G, Biffali E, Borra M, Pannone R (2014) Small non-coding RNA signature in multiple sclerosis patients after treatment with interferon- β . *BMC Med Genomics* 7:26. doi:10.1186/1755-8794-7-26
249. Manna I, Iaccino E, Dattilo V, Barone S, Vecchio E, Mimmi S, Filippelli E, Demonte G, Polidoro S, Granata A, Scannapieco S, Quinto I, Valentino P, Quattrone A (2018) Exosome-associated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring in multiple sclerosis patients. *FASEB J* 32(8):4241–4246. doi:10.1096/fj.201701533R
250. Quintana E, Ortega FJ, Robles-Cedeño R, Villar ML, Buxó M, Mercader JM, Alvarez-Cermeño JC, Pueyo N, Perkal H, Fernández-Real JM, Ramió-Torrentà L (2017) miRNAs in cerebrospinal fluid identify patients with MS and specifically those with lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler* 23(13):1716–1726. doi:10.1177/1352458516684213
251. Yang D, Wang W-Z, Zhang X-M, Yue H, Li B, Lin L, Fu J (2014) MicroRNA expression aberration in Chinese patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Mol Neurosci* 52(1):131–137. doi:10.1007/s12031-013-0138-x
252. Ghadiri N, Emamnia N, Ganjalikhani-Hakemi M, Ghaedi K, Etemadifar M, Salehi M, Shirzad H, Nasr-Esfahani MH (2018) Analysis of the expression of mir-34a, mir-199a, mir-30c and mir-19a in peripheral blood CD4+T lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Gene* 659:109–117. doi:10.1016/j.gene.2018.03.035
253. Nejad C, Pillman KA, Siddle KJ, Pépin G, Änkö M-L, McCoy CE, Beilharz TH, Quintana-Murci L, Goodall GJ, Bracken CP, Gantier MP (2018) miR-222 isoforms are differentially regulated by type-I interferon. *RNA* 24(3):332–341. doi:10.1261/rna.064550.117
254. Pillman KA, Goodall GJ, Bracken CP, Gantier MP (2019) miRNA length variation during macrophage stimulation confounds the interpretation of results: implications for miRNA quantification by RT-qPCR. *RNA* 25(2):232–238. doi:10.1261/rna.069047.118
255. Dedeoğlu BG (2014) High-throughput approaches for microRNA expression analysis. *Methods Mol Biol* 1107:91–103. doi:10.1007/978-1-62703-748-8_6
256. Zhernakova DV, Deelen P, Vermaat M et al (2017) Identification of context-dependent expression quantitative trait loci in whole blood. *Nat Genet* 49(1):139–145. doi:10.1038/ng.3737
257. Raj T, Rothamel K, Mostafavi S, Ye C, Lee MN, Replogle JM, Feng T, Lee M, Asinovski N, Frohlich I, Imboywa S, von Korff A, Okada Y, Patsopoulos NA, Davis S, McCabe C, Paik H, Srivastava GP, Raychaudhuri S, Hafler DA, Koller D, Regev A, Hacohen N, Mathis D, Benoist C, Stranger BE, De Jager PL (2014) Polarization of the effects of autoimmune and neurodegenerative risk alleles in leukocytes. *Science* 344(6183):519–523. doi:10.1126/science.1249547
258. Alasoo K, Rodrigues J, Mukhopadhyay S, Knights AJ, Mann AL, Kundu K, Hale C, Dougan G,
-

- Gaffney DJ (2018) Shared genetic effects on chromatin and gene expression indicate a role for enhancer priming in immune response. *Nat Genet* 50(3):424–431. doi:10.1038/s41588-018-0046-7
- 259.Tian L, Quidam A, Lin F, Shi X (2014) Methods for population-based eQTL analysis in human genetics. *Tinshhua Sci Technol (Tsinghua Science and Technology)* 19(6):624–634. doi:10.1109/TST.2014.6961031
- 260.Brown BC, Bray NL, Pachter L (2018) Expression reflects population structure. *PLoS Genet* 14(12):e1007841. doi:10.1371/journal.pgen.1007841
- 261.Jafari N, Shaghaghi H, Mahmoodi D, Shirzad Z, Alibeiki F, Bohlooli S, Dogaheh HP (2015) Overexpression of microRNA biogenesis machinery: Drosha, DGCR8 and Dicer in multiple sclerosis patients. *J Clin Neurosci* 22(1):200–203. doi:10.1016/j.jocn.2014.06.106
- 262.Aung LL, Balashov KE (2015) Decreased Dicer expression is linked to increased expression of co-stimulatory molecule CD80 on B cells in multiple sclerosis. *Mult Scler* 21(9):1131–1138. doi:10.1177/1352458514560923
- 263.Magner WJ, Weinstock-Guttman B, Rho M, Hojnacki D, Ghazi R, Ramanathan M, Tomasi TB (2016) Dicer and microRNA expression in multiple sclerosis and response to interferon therapy. *J Neuroimmunol* 292:68–78. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.01.009
- 264.Gharesouran J, Taheri M, Sayad A, Ghafouri-Fard S, Mazdeh M, Omrani MD (2019) A Novel Regulatory Function of Long Non-coding RNAs at Different Levels of Gene Expression in Multiple Sclerosis. *J Mol Neurosci* 67(3):434–440. doi:10.1007/s12031-018-1248-2
- 265.Lewkowicz P, Cwiklińska H, Mycko MP, Cichalewska M, Domowicz M, Lewkowicz N, Jurewicz A, Selmaj KW (2015) Dysregulated RNA-Induced Silencing Complex (RISC) Assembly within CNS Corresponds with Abnormal miRNA Expression during Autoimmune Demyelination. *J Neurosci* 35(19):7521–7537. doi:10.1523/JNEUROSCI.4794-14.2015
- 266.Dolati S, Marofi F, Babaloo Z, Aghebati-Maleki L, Roshangar L, Ahmadi M, Rikhtegar R, Yousefi M (2018) Dysregulated Network of miRNAs Involved in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Biomed Pharmacother* 104:280–290. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.050
- 267.Zhang R, Tian A, Wang J, Shen X, Qi G, Tang Y (2015) miR26a modulates Th17/T reg balance in the EAE model of multiple sclerosis by targeting IL6. *Neuromolecular Med* 17(1):24–34. doi:10.1007/s12017-014-8335-5
- 268.Chen C, Zhou Y, Wang J, Yan Y, Peng L, Qiu W (2018) Dysregulated MicroRNA Involvement in Multiple Sclerosis by Induction of T Helper 17 Cell Differentiation. *Front Immunol* 9:1256. doi:10.3389/fimmu.2018.01256
- 269.Galazka G, Mycko MP, Selmaj I, Raine CS, Selmaj KW (2018) Multiple sclerosis: Serum-derived
-

- exosomes express myelin proteins. *Mult Scler* 24(4):449–458. doi:10.1177/1352458517696597
- 270.Selmaj I, Cichalewska M, Namiecinska M, Galazka G, Horzelski W, Selmaj KW, Mycko MP (2017) Global exosome transcriptome profiling reveals biomarkers for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 81(5):703–717. doi:10.1002/ana.24931
- 271.Ascherio A, Munger KL (2010) Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol* 5(3):271–277. doi:10.1007/s11481-010-9201-3
- 272.Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75(5):855–862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4
- 273.Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75(5):843–854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-y
- 274.Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294(5543):853–858. doi:10.1126/science.1064921
- 275.Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294(5543):858–862. doi:10.1126/science.1065062
- 276.Bonneau E, Neveu B, Kostantin E, Tsongalis GJ, De Guire V (2019) How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC* 30(2):114–127
- 277.Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y, Hoang T, Xu X, Mi Q-S, Xin M, Wang F, Appel B, Lu QR (2010) MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 65(5):612–626. doi:10.1016/j.neuron.2010.02.018
- 278.Paul S, Bravo Vázquez LA, Pérez Uribe S, Roxana Reyes-Pérez P, Sharma A (2020) Current Status of microRNA-Based Therapeutic Approaches in Neurodegenerative Disorders. *Cells* 9(7):1698. doi:10.3390/cells9071698
- 279.O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D (2012) microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 30:295–312. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075013
- 280.Singh RP, Massachi I, Manickavel S, Singh S, Rao NP, Hasan S, Mc Curdy DK, Sharma S, Wong D, Hahn BH, Rehimi H (2013) The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 12(12):1160–1165. doi:10.1016/j.autrev.2013.07.003
- 281.Fitzner B, Hecker M, Zettl UK (2015) Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Autoimmun Rev* 14(10):903–913. doi:10.1016/j.autrev.2015.06.001
- 282.Cortese M, Riise T, Bjørnevik K, Bhan A, Farbu E, Grytten N, Hogenesch I, Midgard R, Smith Simonsen C, Telstad W, Ascherio A, Myhr K-M (2016) Preclinical disease activity in multiple

- sclerosis: A prospective study of cognitive performance prior to first symptom. *Ann Neurol* 80(4):616–624. doi:10.1002/ana.24769
283. Harris VK, Tuddenham JF, Sadiq SA (2017) Biomarkers of multiple sclerosis: current findings. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 7:19–29. doi:10.2147/DNND.S98936
284. Nuzziello N, Vilardo L, Pelucchi P, Consiglio A, Liuni S, Trojano M, Liguori M (2018) Investigating the Role of MicroRNA and Transcription Factor Co-regulatory Networks in Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Int J Mol Sci* 19(11):3652. doi:10.3390/ijms19113652
285. Ahlbrecht J, Martino F, Pul R, Skripuletz T, Sühs K-W, Schauerte C, Yildiz Ö, Trebst C, Tasto L, Thum S, Pfanne A, Roesler R, Lauda F, Hecker M, Zettl UK, Tumani H, Thum T, Stangel M (2016) Deregulation of microRNA-181c in cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome is associated with early conversion to relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 22(9):1202–1214. doi:10.1177/1352458515613641
286. Gandhi R (2015) miRNA in multiple sclerosis: search for novel biomarkers. *Mult Scler* 21(9):1095–1103. doi:10.1177/1352458515578771
287. Karussis D, Petrou P (2018) Immune reconstitution therapy (IRT) in multiple sclerosis: the rationale. *Immunol Res* 66(6):642–648. doi:10.1007/s12026-018-9032-5
288. Winkelmann A, Loebermann M, Reisinger EC, Hartung H-P, Zettl UK (2016) Disease-modifying therapies and infectious risks in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 12(4):217–233. doi:10.1038/nrneurol.2016.21
289. Winkelmann A, Loebermann M, Reisinger EC, Zettl UK (2014) Multiple sclerosis treatment and infectious issues: update 2013. *Clin Exp Immunol* 175(3):425–438. doi:10.1111/cei.12226
290. Piket E, Zheleznyakova GY, Kular L, Jagodic M (2019) Small non-coding RNAs as important players, biomarkers and therapeutic targets in multiple sclerosis: A comprehensive overview. *J Autoimmun* 101:17–25. doi:10.1016/j.jaut.2019.04.002
291. Hou J, Lin L, Zhou W, Wang Z, Ding G, Dong Q, Qin L, Wu X, Zheng Y, Yang Y, Tian W, Zhang Q, Wang C, Zhang Q, Zhuang S-M, Zheng L, Liang A, Tao W, Cao X (2011) Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 19(2):232–243. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.001
292. Oberemok VV, Laikova KV, Repetskaya AI, Kenyo IM, Gorlov MV, Kasich IN, Krasnodubets AM, Gal'chinsky NV, Fomochkina IL, Zaitsev AS, Bekirova VV, Seidosmanova EE, Dydik KI, Meshcheryakova AO, Nazarov SA, Smagliy NN, Chelengerova EL, Kulanova AA, Deri K, Subbotkin MV, Useinov RZ, Shumskykh MN, Kubyshkin AV (2018) A Half-Century History of Applications of Antisense Oligonucleotides in Medicine, Agriculture and Forestry: We Should Continue the Journey. *Molecules* 23(6):1302. doi:10.3390/molecules23061302

- 293.Giassafaki L-PN, Siqueira S, Panteris E, Psatha K, Chatzopoulou F, Aivaliotis M, Tzimagiorgis G, Müllertz A, Fatouros DG, Vizirianakis IS (2021) Towards analyzing the potential of exosomes to deliver microRNA therapeutics. *J Cell Physiol* 236(2):1529–1544. doi:10.1002/jcp.29991
- 294.Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368(18):1685–1694. doi:10.1056/NEJMoa1209026
- 295.Ottosen S, Parsley TB, Yang L, Zeh K, van Doorn L-J, van der Veer E, Raney AK, Hodges MR, Patick AK (2015) In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsen, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob Agents Chemother* 59(1):599–608. doi:10.1128/AAC.04220-14

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ebenen für die Untersuchung von molekularbiologischen und biochemischen Prozessen.....	4
Abbildung 2: Therapie der Multiplen Sklerose nach Verlaufsform	7
Abbildung 3: MicroRNA Biogenese.....	9
Abbildung 4: Pri-miRNA Sequenzmotive	12
Abbildung 5: Schematischer Überblick über das Dissertationsprojekt	17
Abbildung 6: Prinzip des Assays zur Analyse auf eine Genotyp-abhängige miRNA-Prozessierung	26
Abbildung 7: Normalisierte Lumineszenzsignale aus den Vorversuchen für die Prozessierungsanalyse.....	47
Abbildung 8: Allelspezifische Prozessierung von miRNA-Vorläufersequenzen im Reporter-Assay	48
Abbildung 9: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomdaten zur Zielgenanalyse.....	51
Abbildung 10: Die Anteile Protein-kodierender und nicht-kodierender potentieller Zielgene von hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934 und hsa-mir-4423	51
Abbildung 11: Ausgeschlossene und ausgewählte Blutproben für die Studie	54
Abbildung 12: Anteil der <i>non-switched memory</i> B-Zell-Subpopulation im Vergleich der Studienkohorten.....	58
Abbildung 13: Differentiell exprimierte miRNAs in B-Zellen im Vergleich der Studienkohorten	62
Abbildung 14: Hauptkomponentenanalyse der Transkriptomprofile von B-Zellen von MS-Patienten und Kontrollen	63
Abbildung 15: eQTL-Analyse für hsa-miR-26a-2-3p, hsa-miR-4423-5p, CTDSP2 und VGLL1	67
Abbildung 16: Darstellung der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit	71

10. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Identifier und chromosomal Positionen der für die Genotypisierung ausgewählten SNPs.....	35
Tabelle 2: Spezifikation des Durchflusszytometrie-Panels.....	38
Tabelle 3: Auswahl von miRNAs und IsomiRs für die Quantifizierung in B-Zellen.....	41
Tabelle 4: Priorisierte microRNAs aus MS-assoziierten genetischen Regionen.....	46
Tabelle 5: Expression von reifen miRNA-Molekülen in HeLa-Zellen nach Transfektion	50
Tabelle 6: Priorisierte Zielgene von hsa-mir-199a-1, hsa-mir-934 und hsa-mir-4423	52
Tabelle 7: Beteiligung der Zielgene von hsa-mir-199a-1 in verschiedenen biologischen Prozessen....	53
Tabelle 8: Charakteristika der Studienkohorten	55
Tabelle 9: Genotypverteilung der untersuchten SNPs für die MS-Patienten und Kontrollen	56
Tabelle 10: Vergleich der Häufigkeiten von B-Zell-Subpopulationen zwischen den Studienkohorten	57
Tabelle 11: Paarweise Vergleiche auf signifikante Unterschiede der Anteile von <i>non-switched memory</i> B-Zellen zwischen den Studienkohorten.....	58
Tabelle 12: Relative Expression von reifen miRNAs in B-Zellen von MS-Patienten und Kontrollen.....	61
Tabelle 13: Expression von miRNA <i>host</i> Genen in B-Zellen von MS-Patienten und Kontrollen	65
Tabelle 14: Assoziationen von SNPs mit miRNA- & <i>host</i> Genexpression.....	66
Tabelle 15: Negative Korrelation der Expressionswerte von hsa-mir-199a-1 und ihren Zielgenen	68
Tabelle 16: Integrative Zusammenfassung der Hauptergebnisse dieser Arbeit	69

11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3' UTR	3' untranslatierte Region
ANCOVA	Kovarianzanalyse
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
circRNA	Zirkuläre RNA (<i>circular RNA</i>)
C_T	<i>Cycle threshold</i>
DMT	Verlaufsmodifizierende Therapie (<i>disease modifying therapy</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
eQTL	<i>Expression quantitative trait loci</i>
fc	<i>Fold change</i>
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>)
GLuc	<i>Gaussia Luciferase</i>
GO	Gen-Ontologie
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien (<i>genome-wide association studies</i>)
HLA	Humane Leukozytenantigene
hsa	<i>Homo sapiens</i>
IFN- β	Interferon- β
IRT	Immunrekonstituierende Therapien
IsomiR	microRNA Isoform
kb	Kilobase
LD	Kopplungsungleichgewicht (<i>linkage disequilibrium</i>)
lncRNA	Lange nicht-kodierende RNA (<i>long non-coding RNA</i>)
MAF	Allelfrequenz des selteneren Allels (<i>minor allele frequency</i>)
MCS	<i>Multiple cloning site</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mfe	Minimale freie Energie
miR	Reife microRNA
miRNA	MicroRNA
MIR SNP	MS-assozierter SNP in oder nahe miRNA-kodierender Sequenz
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
nt	Nukleotid
OR	<i>Odds ratio</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
PPMS	Primär progrediente MS
pre-miRNA	Vorläufer miRNA (<i>precursor miRNA</i>)
pri-miRNA	Primäre miRNA
qPCR	Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion (<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
RIN	RNA-Integritätszahl (<i>RNA integrity number</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	<i>Reads per million</i>
RRMS	Schubförmig remittierende MS (<i>relapsing-remitting MS</i>)
RT	Raumtemperatur
RuBu	Laufpuffer (<i>running buffer</i>)
SEAP	Sekretierte alkalische Phosphatase
siRNA	Kleine interferierende RNA (<i>small interfering RNA</i>)
snoRNA	Kleine nukleoläre RNA
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SPMS	Sekundär progrediente MS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SSC	Seitwärtsstreuung (<i>sideward scatter</i>)
TAC	<i>Transcriptome Analysis Console</i>
TY-Amp	Ampicillin-supplementiertes TY-Medium
ZNS	Zentrales Nervensystem

12. ANHANG

12.1 MATERIALIEN

Tabelle S 1: Zellen und Zellkulturmedien

Produkt	Bezugsquelle
0,05 % Trypsin-EDTA (1x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
DMEM (1x) + GlutaMAX™-I	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
- mit FBS Superior, standardized	Merck KGaA, Darmstadt
- mit Pen Strep (5000 u/ml Penicillin und 5000 µg/ml Streptomycin)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
DPBS (1x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
HeLa cell line	German Cancer Research Center, Heidelberg
Opti-MEM® I (1x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)

Tabelle S 2: Genetische Konstrukte von GeneCopoeia

Beschreibung	Katalognr.
Homo sapiens miR-16-1 stem-loop	HmiR0196-MR04
Homo sapiens miR-199a-1 stem-loop	HmiR0296-MR04
Homo sapiens miR-26a-2 stem-loop	HmiR0441-MR04
Homo sapiens mir-548ac stem-loop	HmiR1085-MR04
Homo sapiens miR-934 stem-loop	HmiR0528-MR04
Homo sapiens mir-3661 stem-loop	HmiR0978-MR04
Homo sapiens miR-3671 stem-loop	HmiR0988-MR04
Homo sapiens miR-4252 stem-loop	HmiR0900-MR04
Homo sapiens mir-4304 stem-loop	HmiR0868-MR04
Homo sapiens mir-4423 stem-loop	HmiR1083-MR04
Homo sapiens miR-4464 stem-loop	HmiR1135-MR04
Homo sapiens mir-4492 stem-loop	HmiR1176-MR04
Luciferase reporter vector	CmiT000001-MT05
miRNA scrambled control clone	CmiR0001-MR04

Tabelle S 3: Mutagenese-Primer von Thermo Fisher Scientific (custom Primer, je 25 nmol, entsalzt)

Primer	Sequenz
MR4rs1414273_5034_FW	TTTGCACTAACCTAATAGTTACTACAAAAA
MR4rs1414273_5034_RV	TTTTGTAGTAACTATTAGGTTAGTGCAAAA
mut_HmiR0196_F	GCTTGAATTGAAACACAACGTAAAGTATGGTCAACCTTACTTCAG
mut_HmiR0196_R	CTGAAGTAAGGTTGACCATACTTACAGTTGTGTTCAATTCAAGC
mut_HmiR0296_F	GGCCTGTCTCGATGAGCCGCTCACC
mut_HmiR0296_R	GGTGAGCGGCTCATCGAGACAGGCC
mut_HmiR0441_F	CTCTGTTCCGGCGACGGACCATCAGCTG
mut_HmiR0441_R	CAGCTGATGGTCCGTCGCCGGAAACAGAG
mut_HmiR0528_F	GTAGTAGACAGAAGCTTATTCTCAAGTCAGTCAGGA

ANHANG

mut_HmiR0528_R	TCCTGAGAACGAACTTGAGAAATAAGCTTGTCTACTAC
mut_HmiR0868-83G_F	CTCCAAGCTAGGAGAACGGACAGTCCCTGA
mut_HmiR0868-83G_R	TCAGGGAACGTCCGTTCTCCTAGCTGGAG
mut_HmiR0868-92C_F	CCACTTCTCTCAACCTAGGAGACCGGAC
mut_HmiR0868-92C_R	GTCCGGTCTCTAGGTTGGAGAGAAGTGG
mut_HmiR0868-83G92C_F	CCACTTCTCTCAACCTAGGAGAACGGACAGTCCCTG
mut_HmiR0868-83G92C_R	CAGGGAACTGTCCGTTCTCCTAGGTTGGAGAGAAGTGG
mut_HmiR0900_F	CCTGACCCCTTCCCAGGCCATGCCAGG
mut_HmiR0900_R	CCTGGCATGGCCTGGGAAGGGGTCAAG
mut_HmiR0978_F	GGCTGGGGCGGGGGGCATCATGGAC
mut_HmiR0978_R	GTCCATGATGCCCGGCCAGCC
mut_HmiR0988_F	GTGACAGCAGCAGCAGTAACATAGGCATTCAAGTAATATTCTTT
mut_HmiR0988_R	AAAAGAATATTTACTGAATGCCTATGTTACTGCTGCTGCTCAC
mut_HmiR1083_F	GCTCCAAGCTTTGTCTCAGTTACATACTGT
mut_HmiR1083_R	ACAGTATGTGAAACTGAGACACAAAAGAGCTTGGAGC
mut_HmiR1135-145G_F	TAGATTGAAGCAATTATTGAATTGATTCACATTGGGGCC
mut_HmiR1135-145G_R	GGCCCCAAATGTGGAATCGAAATTCAAATAAAATTGCTCAATCTA
mut_HmiR1135-352G_F	CCTACTACACACACATGCAGCACAAACTCTGAAT
mut_HmiR1135-352G_R	ATTCAGAGTTTGTGCTGCATGTATGTGTAGTAGG
mut_HmiR1176_F	CTCTGAGCCTGTGCTGGCAGCACCC
mut_HmiR1176_R	GGGTGCTGCCAGCACAGGCTCAGAG

Tabelle S 4: TaqMan® MicroRNA Assays von Thermo Fisher Scientific

miRNA Assay Name	Assay ID
has-miR-199a-5p	000498
has-miR-199a-3p	002304
has-miR-934-5p	002177
has-miR-4423-5p	463608_mat
has-miR-4423-3p	462182_mat
has-miR-191-5p	002299

Tabelle S 5: Antikörper & Farbstoffe für durchflusszytometrische Analysen

Antikörper	Bezugsquelle
Brilliant Violet 421™ anti-human CD23 Antibody (Clone EBVCS-5)	BioLegend, San Diego (CA, USA)
BV750 Mouse Anti-Human IgD (Clone IA6-2)	BD Inc., Franklin Lakes (NJ, USA)
BV750 Mouse IgG2a, κ Isotype Control	BD Inc., Franklin Lakes (NJ, USA)
CD14-PE, human (Clone TÜK4)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD19-FITC, human (Clone LT19)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD20-FITC, human (Clone LT20)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD21-APC, human (Clone REA940)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD24-APC-Vio770, human (Clone REA832)	BioLegend, San Diego (CA, USA)
CD3-PerCP, human (Clone BW264/56)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PE anti-human CD27 Antibody (Clone O323)	BioLegend, San Diego (CA, USA)

PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	BioLegend, San Diego (CA, USA)
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD38 Antibody (Clone HIT2)	BioLegend, San Diego (CA, USA)
PE/Dazzle™ 594 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	BioLegend, San Diego (CA, USA)
PerCP anti-human CD19 Antibody (Clone HIB19)	BioLegend, San Diego (CA, USA)
PerCP Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	BioLegend, San Diego (CA, USA)
REA Control (S)-APC antibody	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zombie Green™ Fixable Viability Kit	BioLegend, San Diego (CA, USA)

Tabelle S 6: Enzyme, Puffer & DNA-Marker für die Klonierung

Enzym	Bezugsquelle
10x Buffer Tango, with BSA	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
BcuI (SpeI) Restriktionsenzym (10 u/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
EcoRI Restriktionsenzym (10 u/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
SfaI (AsiSI) Restriktionsenzym (10 u/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
XbaI Restriktionsenzym (10 u/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
λ DNA/EcoRI+HindIII, 3 (0,5 μg/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
ΦX174 DNA/BsuRI, 9 (0,5 μg/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)

Tabelle S 7: Assay-Kits & -Komponenten

Produkt	Bezugsquelle
Agilent RNA 6000 Nano Reagents	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (CA, USA)
Agilent RNA 6000 Pico Reagents	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (CA, USA)
Clariom™ D Array, human Microarrays	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
miRNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Pan B Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Midi Cartridges	QIAGEN, Hilden
QIAfilter™ Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN-tip 100	QIAGEN, Hilden
Qubit® dsDNA BR Assay Kits	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (CA, USA)
RNA Nano Chips	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (CA, USA)
RNA Pico Chips	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (CA, USA)
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden
Secreta-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit	GeneCopoeia Inc., Rockville (MD, USA)
TaqMan® Custom PreAmp Pool	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
TaqMan® Custom RT Pool	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
TaqMan® Gene Expression Custom Array Card	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)

TaqMan® PreAmp Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
TaqMan™ SNP Genotyping Custom Array Card	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
XL10-Gold® Ultracompetent Cells	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (CA, USA)

Tabelle S 8: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Bezugsquelle
2-Propanol (Isopropylalkohol)	WALTER CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Agar-Agar, bakteriologisch, Dichte 0,55	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin-Ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm
autoMACS™ Rinsing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
autoMACS™ Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
autoMACS™ Washing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Biofreeze Einfriermedium, animal component free	Biochrom GmbH, Berlin
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Borsäure ($\geq 99,8\%$, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau, Na-Salz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloroform, BAKER ANALYZED®	Avantor Performance Materials B.V., Deventer (NL)
DEPC-Treated Water, Nuclease-Free	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
D(+) Glucose, anhydrous	Merck KGaA, Darmstadt
Endotoxin-free TE buffer	QIAGEN, Hilden
Essigsäure, ROTIPURAN® (100 %, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, vergällt (70 Vol. % & 96 Vol. %)	WALTER CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Ethanol absolut, unvergällt	WALTER CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Ethidiumbromid (1 %, 10 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis (MO, USA)
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega Inc., Fichtburg (WI, USA)
Glycerin (ROTIPURAN® $\geq 99,5\%$, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt (pulv., für die Bakteriologie)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Histopaque®-1077 (sterile-filtered)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis (MO, USA)
Kaliumacetat (reinst)	Merck KGaA, Darmstadt
LiChrosolv® Water for chromatography	Merck KGaA, Darmstadt
MgCl (25 nM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
Natriumchlorid ($>99,5\%$, p.a., ASC, ISO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid ($\geq 99\%$ p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
neoLab Bad Stabil® Wasserbadstabilisator	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Nuclease-free water	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS, ultra pure ($\geq 99,9\%$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
TRIS PUFFERAN® ($\geq 99,9\%$, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Tabelle S 9: Zusammensetzung von Puffern und anderen Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10 x TBE	108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), <i>ad 1 l</i> Aqua dest.
50 x TAE	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), <i>ad 1 l</i> Aqua dest.
Bromphenolblau	0,25 % Bromphenolblau, 50 mM EDTA, 50 % Glycerin, <i>ad</i> Aqua dest.
LB-Agar	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Pepton aus Casein, 15 g Agar-Agar, 1 ml 100 mg/ml Ampicillin, <i>ad 1 l</i> Aqua dest.
Plasmidlösung I	50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris HCl (pH 6 – 8), <i>ad</i> Aqua dest.
Plasmidlösung II	0,2 M NaOH, 1 % SDS, <i>ad</i> Aqua dest.
Plasmidlösung III	3 M Kaliumacetat, 11,5 % Essigsäure, <i>ad</i> Aqua dest.
TY-Medium	5 g NaCl, 10 g Hefeextrakt, 16 g Pepton aus Casein, <i>ad 1 l</i> Aqua dest.

Tabelle S 10: Geräte

Gerät	Bezugsquelle
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (CA, USA)
autoMACS® Pro Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Azure c200 Gel Imager	Azure Biosystems Inc., Dublin (CA, USA)
Biofuge fresco Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Biofuge pico Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
BioMate™ 3 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
Biometra Standard Power Pack P25	Analytik Jena AG, Jena
CB 160 CO ₂ Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
CoolCell® LX	Brooks Automation Inc., Chelmsford (MA, USA)
Elix® Advantage Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, Darmstadt
FACSAria™ Illu	BD Inc., Franklin Lakes (NJ, USA)
FACSCalibur™	BD Inc., Franklin Lakes (NJ, USA)
Fluidic Card Sealer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
Function Line B12 Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
GeneAmp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
GeneChip® Fluidics Station 450	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
GeneChip® Hybridization Oven 645	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
GeneChip® Scanner	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
GloMax®-Multi Detection System	Promega Inc., Fichtburg (WI, USA)
HBT 130-2 Thermoblock	HLC – Haep Labor Consult, Bovenden
HERASAFE KS Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
IKAMAG® RH Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Megafuge 1.0 Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
MIKRO 22 R Zentrifuge	Hettich GmbH & Co. oHG, Kirchlengern
Multifuge 3SR+ Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
Neubauer-improved Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pipetboy acu 2	Integra Biosciences AG, Zizers (Schweiz)
PIPETMAN Pipetten (verschiedene)	Gilson Inc., Middleton (WI, USA)
Qubit® Fluorometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
REAX 2000 Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

ANHANG

TFP – 20M UV-Tisch	Biometra GmbH, Göttingen
TH 25 Schüttelinkubator	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen
TMS-F Mikroskop	Nikon Inc., Tokio (JP)
Vacuum Concentrator	Bachofer GmbH & Co. KG, Reutlingen
ViiA 7 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
Wasserbad 1003	GFL mbH, Burgwedel

Tabelle S 11: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
Adhesive Sealing Sheets	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
BD Discardit™ II Spritzen (10 ml)	BD Inc., Franklin Lakes (NJ, USA)
biopur safe-lock tubes (1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
CELLSTAR® Cell Culture Flasks (verschiedene)	Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster (AT)
CELLSTAR® Cell Culture Plate (verschiedene)	Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster (AT)
CELLSTAR® serological pipette (verschiedene)	Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster (AT)
CELLSTAR® tubes (verschiedene)	Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster (AT)
CRYO.S™ cap inserts	Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster (AT)
CRYO.S™ cryoconservation tubes (2 ml)	Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster (AT)
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert (1,8 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Filter tips PP (verschiedene)	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen
Falcon Polystyrene Round-Bottom Tube (5 ml)	Corning Inc., Corning (NY, USA)
Küvetten, Polystyrol (10 mm x 4 mm x 45 mm)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
np Safelock-cap Reaktionsgefäße PP (1,5 ml)	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen
Nunclon™ Delta Surface Petrischalen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
OptiPlate™ - 96 Microplates	PerkinElmer Inc., Waltham (MA, USA)
Pasteurpipetten ohne Wattestopfen, unsteril (2 ml, 230 mm Länge, 140 mm Spitze)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pipette tips PP refill system (verschiedene)	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen
Sanger DNA-Sequenzierung Barcode, Economy Run	Microsynth Seqlab GmbH, Göttingen
Safe-LockTubes, RNase free (0,5 ml free)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (CA, USA)
Semi-skirted 96 well PCR plate	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sterican® Einmalkanülen (0.80 mm x 120 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Tabelle S 12: Softwares

Softwares & Tools	Bezugsquelle
Citavi 6.8	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil (CHE)
Custom TaqMan® Small RNA Assay Design Tool	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
ExpressionSuite Software 1.3	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
FACSDiva™ v.8.0.2	BD Inc., Franklin Lakes (NJ, USA)
Flowing Software 2.5.1	Turku Bioscience, Turku (FI)
FlowJo 10.6.1	FlowJo LLC, Ashland (OR, USA)
Microsoft® Office 2003	Microsoft Inc., Redmond (WA, USA)
QuikChange® Primer Design Program	Agilent Technologies Inc., Santa Clara (CA, USA)

R version 4.0	The R Foundation, Wien (AT)
Rstudio Desktop 1.2	Rstudio Inc., Boston (MA, USA)
RNAhybrid version 2.2	Universität Bielefeld, Bielefeld
TaqMan® Genotyper Software 1.6	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
Transcriptome Analysis Console 4.0.2	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA, USA)

Tabelle S 13: Datenbanken & Webtools

Datenbanken & Webtools	Bezugsquelle
ClinicalTrials.gov	U.S. National Library of Medicine, Bethesda (MD, USA) (https://clinicaltrials.gov/)
Enrichr	Ma'ayan Lab, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York (NY, USA) (https://maayanlab.cloud/Enrichr/)
Ensembl BioMart	BioMart project (https://www.ensembl.org/biomart/)
GTEx Portal	Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge (MA, USA) (https://www.gtexportal.org/home/index.html/)
HGNC genenames	HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute, Cambridge (UK) (https://www.genenames.org/)
IsomiR Bank	BioStaCs Group, University of Science and Technology of China, Hefei (CHN) (https://mcg.ustc.edu.cn/bsc/129somer/)
LDlink 3.0	National Cancer Institute, Bethesda (MD, USA) (https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=home/)
Meta-Chart	meta-chart.com (https://www.meta-chart.com/)
miRBase Version 22	Griffiths-Jones Lab, University of Manchester, Manchester (UK) (http://www.mirbase.org/)
miRCarta 1.1	Saarland University, Saarbrücken (https://mircarta.cs.uni-saarland.de/)
miRNA expression atlas	RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama (JPN) (https://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/reports/#miRNA_expression_atlas_human/)
miRTarBase Version 8	National Chiao Tung University, Hsinchu (TW) (http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/)
miRWalk 3.0	Universität Heidelberg, Heidelberg (http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/)
OMIM	Johns Hopkins University, Baltimore (MD, USA) (https://omim.org/)
PubMed	National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD, USA) (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/)
Reactome Version 75	The Reactome Project (https://reactome.org/)
Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP builds 150, 151 & 153)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD, USA) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/)
The Human Protein Atlas	SciLifeLab, Solna (SWE) (http://www.proteinatlas.org/)
UCSC Genome Browser (assembly hg38)	University of California, Santa Cruz (CA, USA) (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway/)

12.2 GATING-STRATEGIE FÜR DIE B-ZELL-PHÄNOTYPISIERUNG

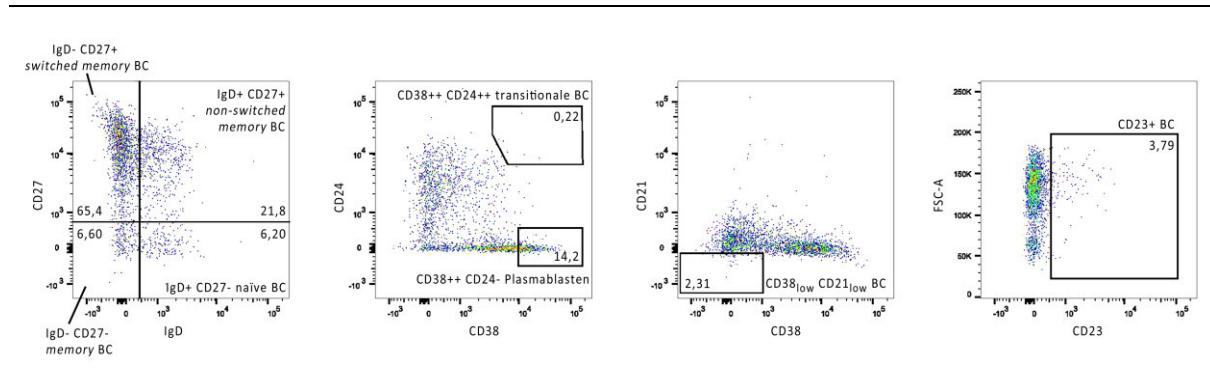


Abbildung S 1: Gating-Strategie für die B-Zell-Phänotypisierung anhand der Probe H02. Gezeigt sind alle Events, die aus dem Gating von lebenden einzelnen $CD19^+$ Zellen hervorgingen (s. Kapitel 4.10). B-Zell-Subpopulationen, die durch CD21, CD23, CD24, CD27, CD38, den FSC-A und IgD unterscheidbar sind, wurden durchflusszytometrisch analysiert (adaptiert nach [171]). CD27 wurde gegen IgD aufgetragen, um $CD27^+$ IgD $^-$ *switched memory*-B-Zellen, $CD27^+$ IgD $^+$ *non-switched memory*-B-Zellen, $CD27^-$ IgD $^-$ *memory*-B-Zellen und $CD27^-$ IgD $^+$ naïve B-Zellen zu identifizieren. Transitionale B-Zellen wurden als $CD24^{++}$ $CD38^{++}$ Zellen definiert. Plasmablasten wurden als $CD24^-$ $CD38^{++}$ Zellen definiert. Darüber hinaus wurden $CD21_{low}$ $CD38_{low}$ B-Zellen und $CD23^+$ B-Zellen unterschieden. Die numerischen Werte in den Gates geben Prozentsätze bezogen auf alle lebenden einzelnen $CD19^+$ Zellen an. BC = B-Zellen; FSC-A = Fläche des Signals für die Vorwärtsstreuung.

12.3 WEITERE GENETISCH MIT MS ASSOZIIERTE MICRORNAs

Tabelle S 14: Weitere microRNAs mit naheliegenden SNPs in LD mit MS *lead* SNPs

miRNA	MS <i>lead</i> SNP	Distanz	miRNA	MS <i>lead</i> SNP	Distanz	miRNA	MS <i>lead</i> SNP	Distanz
hsa-mir-21	rs2150879	59417	hsa-mir-3191	rs11083862	91662	hsa-mir-6745	rs2269434	159124
hsa-mir-101-1	rs72922276	94798	hsa-mir-3662	rs2327586	194656	hsa-mir-6758	rs701006	200303
hsa-mir-196b	rs10951154	73785	hsa-mir-3678	rs9900529	66374	hsa-mir-6759	rs701006	35565
hsa-mir-219a-1	rs11751659	93980	hsa-mir-3925	rs1076928	241524	hsa-mir-6760	rs3184504	142595
hsa-mir-219a-1	rs9277626	93789	hsa-mir-4309	rs12588969	224695	hsa-mir-6785	rs9900529	158853
hsa-mir-548a-2	rs2327586	65072	hsa-mir-4315-1	rs7222450	145059	hsa-mir-6793	rs12609500	234217
hsa-mir-548at	rs1026916	116956	hsa-mir-4324	rs1465697	25121	hsa-mir-6832	rs2229092	60807
hsa-mir-548h-2	rs34947566	12542	hsa-mir-4487	rs2269434	62109	hsa-mir-6832	rs2523500	83210
hsa-mir-616	rs701006	193794	hsa-mir-4531	rs7260482	13044	hsa-mir-6832	rs3093982	104320
hsa-mir-661	rs3923387	32566	hsa-mir-4646	rs2229092	128049	hsa-mir-6833	rs17493811	2194
hsa-mir-1181	rs28834106	77930	hsa-mir-4646	rs2523500	150452	hsa-mir-6834	rs11751659	176390
hsa-mir-1181	rs34536443	51016	hsa-mir-4646	rs3093982	171562	hsa-mir-6834	rs9277626	176199
hsa-mir-1204	rs6990534	5817	hsa-mir-4728	rs9909593	87335	hsa-mir-6846	rs3923387	144696
hsa-mir-1236	rs17493811	220682	hsa-mir-4746	rs12971909	20421	hsa-mir-6866	rs883871	65526
hsa-mir-1237	rs11231749	40896	hsa-mir-5010	rs1026916	136371	hsa-mir-6867	rs883871	97190
hsa-mir-1284	rs9878602	55783	hsa-mir-6090	rs4262739	28831	hsa-mir-6871	rs6072343	170470
hsa-mir-3155a	rs11256593	76837	hsa-mir-6501	rs9808753	135657	hsa-mir-6873	rs11751659	173372
hsa-mir-3155a	rs12722559	123886	hsa-mir-6716	rs12365699	228498	hsa-mir-6873	rs9277626	173181
hsa-mir-3155b	rs11256593	76848	hsa-mir-6716	rs34026809	34020	hsa-mir-6884	rs9909593	212436
hsa-mir-3155b	rs12722559	123897	hsa-mir-6716	rs6589706	233025	hsa-mir-6886	rs12609500	50222
hsa-mir-3188	rs4808760	90908	hsa-mir-6721	rs17493811	7506	hsa-mir-7155	rs11231749	14143
hsa-mir-3190	rs11083862	91660	hsa-mir-6729	rs198398	205873	hsa-mir-8072	rs7975763	245258

Weitere 54 miRNA-kodierende Sequenzen (miRBase Version 21) liegen laut dem LDproxy-Tool [38] in genetischen Regionen mit SNPs, die in schwachem LD (mit $r^2 > 0,1$) mit MS-assoziierten *lead* SNPs [36] sind. Eine weitere miRNA, hsa-mir-6891, liegt außerdem nur 200 bp von der MS-assoziierten Variante HLA-B*38:01 (nicht in dbSNP 151 enthalten) entfernt. Die Distanzen zwischen den miRNA-kodierenden Sequenzen und den MS *lead* SNPs sind in bp angegeben. Einige der miRNA-Vorläufer-Sequenzen sind in der Nähe von mehreren MS *lead* SNPs lokalisiert. LD = Kopplungsungleichgewicht; MS = Multiple Sklerose; SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus.

12.4 PRIORISIERTE ZIELGENE

Tabelle S 15: Priorisierte Zielgene von hsa-mir-199a-1

Gensymbol	Chromosom	Probe set ID	fc (24 h)	p (24 h)	fc (48 h)	p (48 h)	mfe (kcal/mol)
ACTN4	19	TC1900008020.hg.1	-1,87	0,0346	-2,12	0,0006	-22,4
AMZ2	17	TC1700008734.hg.1	-1,73	0,0359	-1,54	0,0043	-23,3
ARHGAP31	3	TC0300008467.hg.1	-1,49	0,0213	-1,69	0,0003	-26,3
ARPC1A	7	TC0700013419.hg.1	-1,82	0,0453	-1,65	0,0285	-18,8
BMP1	8	TC0800006975.hg.1	-2,88	0,0037	-2,55	0,0004	-28,4
CARD19	9	TC0900007977.hg.1	-1,78	0,0202	-1,48	0,0212	-26,0
CD9	12	TC1200006604.hg.1	-1,78	0,0218	-1,72	0,0241	-19,0
CDK4	12	TC1200010977.hg.1	-1,81	0,0239	-1,68	0,0065	-20,9
CIZ1	9	TC0900011626.hg.1	-1,69	0,0284	-1,52	0,0043	-22,7
CSNK1G2	19	TC1900006565.hg.1	-1,90	0,0172	-1,92	0,0013	-26,9
CSRNP1	3	TC0300010770.hg.1	-1,97	0,0140	-2,52	0,0002	-23,5
DYRK1B	19	TSUnmapped00000019.hg.1	-2,00	0,0204	-1,85	0,0018	-21,6
DYRK1B	19	TSUnmapped00000256.hg.1	-1,83	0,0217	-1,37	0,0443	-21,6
EEF2	19	TC1900009316.hg.1	-1,53	0,0383	-1,42	0,0203	-16,1
EFNA1	1	TC0100010111.hg.1	-1,59	0,0494	-2,78	8,9e-07	-17,4
EPST11	13	TC1300008760.hg.1	-1,73	0,0059	-1,54	0,0024	-20,3
FAIM	3	TC0300008952.hg.1	-1,86	0,0186	-1,38	0,0465	-16,6
FEN1	11	TC1100013021.hg.1	-1,75	0,0164	-1,51	0,0202	-21,8
FXR2	17	TC1700009649.hg.1	-2,02	0,0363	-2,06	0,0015	-26,1
HEATR3	16	TC1600007806.hg.1	-1,61	0,0374	-1,52	0,0196	-20,4
HTRA2	2	TC0200008090.hg.1	-1,72	0,0483	-2,41	0,0005	-18,7
IER3	6	TC0600011386.hg.1	-2,14	0,0022	-1,73	0,0049	-22,9
IRAK2	3	TC0300006580.hg.1	-1,72	0,0447	-1,48	0,0435	-23,0
MAP3K12	12	TC1200010806.hg.1	-1,89	0,0278	-1,94	0,0103	-24,0
MIF	22	TC2200009231.hg.1	-1,89	0,0498	-1,49	0,0370	-25,9
MLX	17	TC1700007899.hg.1	-1,99	0,0079	-2,14	0,0003	-23,4
MRPS36	5	TC0500007667.hg.1	-2,06	0,0243	-1,43	0,0268	-25,1
MTG2	20	TC2000007994.hg.1	-1,59	0,0360	-2,08	0,0002	-25,8
NACC1	19	TC1900007125.hg.1	-1,84	0,0483	-3,19	1,6e-05	-25,8
NDUFA11	19	TC1900011851.hg.1	-1,79	0,0452	-2,07	0,0002	-31,7
NT5C	17	TC1700011736.hg.1	-1,68	0,0427	-1,35	0,0134	-19,4
OGFOD3	17	TC1700012120.hg.1	-1,73	0,0404	-1,42	0,0450	-25,1
OR8B3	11	TC1100012667.hg.1	-2,02	0,0098	-1,54	0,0362	-23,0
PACS1	11	TC1100008054.hg.1	-1,81	0,0432	-1,84	0,0039	-22,0
PEA15	1	TC0100010284.hg.1	-1,67	0,0477	-1,81	0,0035	-24,3
PFKP	10	TC1000012423.hg.1	-1,57	0,0389	-1,37	0,0394	-23,8
PNPLA6	19	TC1900011654.hg.1	-1,87	0,0264	-3,37	4,7e-05	-18,8
PON2	7	TC0700011835.hg.1	-1,73	0,0478	-1,31	0,0153	-24,6
PPIB	15	TC1500009736.hg.1	-1,59	0,0088	-1,38	0,0124	-29,2
PRMT1	19	TC1900011781.hg.1	-1,71	0,0323	-1,99	0,0007	-24,4
PROCR	20	TC2000007209.hg.1	-1,73	0,0498	-1,65	0,0027	-18,9
RAB8A	19	TC1900011682.hg.1	-1,83	0,0184	-1,47	0,0453	-21,2
RAD9A	11	TC1100013054.hg.1	-1,87	0,0037	-1,52	0,0052	-23,9

ANHANG

RAP2B	3	TC0300009229.hg.1	-1,58	0,0140	-1,25	0,0185	-26,7
RPS29	14	TC1400010741.hg.1	-1,64	0,0488	-1,33	0,0244	-26,8
SIRT6	19	TC1900009328.hg.1	-1,51	0,0377	-1,62	0,0019	-25,1
SPATA2	20	TC2000009401.hg.1	-1,82	0,0126	-1,28	0,0242	-24,8
TAC1	7	TC0700008435.hg.1	-1,71	0,0294	-1,26	0,0217	-23,8
TCEAL3	X	TC0X00011315.hg.1	-1,53	0,0447	-1,41	0,0217	-16,1
TMOD2	15	TC1500007238.hg.1	-1,61	0,0443	-1,20	0,0237	-25,7
TNFRSF12A	16	TC1600006652.hg.1	-2,23	0,0376	-2,76	0,0009	-22,7
TPRA1	3	TC0300012315.hg.1	-1,78	0,0460	-2,69	0,0001	-27,2
TRAF1	9	TC0900011393.hg.1	-2,46	0,0025	-2,48	0,0002	-28,6
TUBB6	18	TC1800006731.hg.1	-1,67	0,0152	-1,32	0,0166	-23,2
UBE2D1	10	TC1000007700.hg.1	-1,73	0,0383	-1,81	0,0007	-18,7
VIM	10	TC1000009922.hg.1	-2,04	0,0105	-1,77	0,0141	-23,9
ZDHHC3	3	TSUnmapped00000494.hg.1	-1,52	0,0149	-1,71	0,0001	-27,0
ZFYVE27	10	TC1000008587.hg.1	-1,62	0,0190	-1,54	0,0013	-28,6
ZNF511	10	TC1000012510.hg.1	-1,87	0,0417	-1,57	0,0357	-22,8
ZNF526	19	TC1900008180.hg.1	-1,79	0,0496	-2,33	0,0008	-22,4
ZNF579	19	TC1900011483.hg.1	-1,54	0,0235	-1,24	0,0269	-31,7

Für alle priorisierten Zielgene von hsa-mir-199a-1, ist angegeben, auf welchem Chromosom sie kodiert werden und wie die zugehörigen *probe set* IDs auf Clariom D-Arrays heißen. Die *fcs* (*fold changes*) der Genexpression in HeLa-Zellen, in denen hsa-mir-199a-1 überexprimiert wurde, im Vergleich zu Zellen, die mit dem Kontrollplasmid behandelt wurden, und *p*-Werte (*p*) wurden in der Software TAC berechnet. Die *fcs* und *p*-Werte für die Vergleiche 24 h und 48 h nach Transfektion der HeLa-Zellen sind angegeben. Die *mfes* (minimale freie Energien) für die Bindungen zwischen den reifen hsa-miR-199a-5p und -3p-Molekülen und den priorisierten Zielgenen wurden *in silico* mit RNAhybrid [160] berechnet und jeweils die niedrigsten Werte wurden angegeben. Die 26 Zielgene, die auch durch miRWalk 3.0 vorhergesagt wurden sind fett markiert.

Tabelle S 16: Priorisierte Zielgene von hsa-mir-934

Gensymbol	Chromosom	Probe set ID	fc (24 h)	p (24 h)	fc (48 h)	p (48 h)	mfe (kcal/mol)
C1orf162	1	TC0100009417.hg.1	-1,76	0,0031	-1,33	0,0224	-18,4
CHORDC1	11	TC1100011930.hg.1	-1,86	0,0463	-1,75	0,0015	-23,1
EGR1	5	TC0500008785.hg.1	-1,98	0,0468	-2,31	0,0013	-21,1
ETF1	5	TC0500012179.hg.1	-2,21	0,0183	-1,70	0,0335	-27,8
GADD45B	19	TC1900006588.hg.1	-2,61	0,0010	-1,52	0,0197	-24,4
GTF2H1	11	TC1100006998.hg.1	-2,25	0,0489	-1,81	0,0165	-25,0
KLHL15	X	TC0X00009256.hg.1	-2,39	0,0071	-1,83	0,0100	-23,0
SFPQ	1	TC0100018431.hg.1	-2,29	0,0006	-1,75	0,0024	-26,8
SLC16A1	1	TC0100015310.hg.1	-2,60	0,0018	-1,93	0,0125	-29,3
ZZ3	1	TC0100014650.hg.1	-2,33	0,0116	-1,49	0,0252	-22,5

Abkürzungen: s. Beschreibung von Tabelle S 15.

Tabelle S 17: Priorisiertes Zielgen von hsa-mir-4423

Gensymbol	Chromosom	Probe set ID	fc (24 h)	p (24 h)	fc (48 h)	p (48 h)	mfe (kcal/mol)
TMEM47	X	TC0X00009356.hg.1	-1,56	0,0378	-1,41	0,0367	-21,3

Abkürzungen: s. Beschreibung von Tabelle S 15.

12.5 TRANSKRIPTLEVEL VON AN DER MICRORNA-BIOGENESE BETEILIGTEN GENEN

Tabelle S 18: Expression von an der kanonischen miRNA-Biogenese beteiligten Genen in MS-Patienten und Kontrollen

Gen	Kontrollen MW ± SD	PPMS MW ± SD	RRMS vor IRT MW ± SD	RRMS Natalizu- mab MW ± SD	RRMS Alemtuzu- mab MW ± SD	RRMS Cladribin MW ± SD	p-Wert
AGO2	8,957 ± 0,373	8,988 ± 0,502	8,944 ± 0,569	8,273 ± 0,652	9,190 ± 0,458	9,208 ± 0,350	1,1e-07*
DGCR8	6,540 ± 0,333	6,649 ± 0,478	6,499 ± 0,534	6,174 ± 0,474	6,420 ± 0,435	6,882 ± 0,158	0,0239*
DICER1	10,518 ± 0,343	10,358 ± 0,592	10,440 ± 0,478	10,655 ± 0,538	10,554 ± 0,383	10,455 ± 0,396	0,8159
DROSH A	9,345 ± 0,316	9,512 ± 0,584	9,774 ± 0,468	9,374 ± 0,409	9,474 ± 0,371	9,894 ± 0,318	0,0100*
TARBP2	3,668 ± 0,233	3,638 ± 0,288	3,590 ± 0,152	3,873 ± 0,274	3,655 ± 0,325	3,486 ± 0,163	0,0358*
XPO5	7,192 ± 0,403	7,105 ± 0,364	7,031 ± 0,571	7,123 ± 0,374	7,146 ± 0,269	7,141 ± 0,381	0,9843

Die Tukey-biweight Mittelwerte und Standardabweichungen (MW ± SD) der log2 Signalwerte von sechs an der kanonischen miRNA-Biogenese beteiligten Genen sind dargestellt. Der p-Wert gibt an, ob es einen signifikanten Unterschied in der Genexpression zwischen den Studienkohorten gibt (F-Test, lineares Modell, adjustiert für Alter und Geschlecht). Signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind mit einem * markiert. Die niedrigsten (blau) und höchsten Werte (gelb) sind hervorgehoben. IRT = Immunrekonstituierende Therapien; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubförmig remittierende MS.

12.6 TRANSKRIPTLEVEL VON ZIELGENEN VON HSA-MIR-199A-1

Tabelle S 19: Im Gruppenvergleich differentiell exprimierte Zielgene von hsa-mir-199a-1

Gen	Kontrollen MW ± SD	PPMS MW ± SD	RRMS vor IRT MW ± SD	RRMS Natali. MW ± SD	RRMS Alemtu. MW ± SD	RRMS Cladribin MW ± SD	p-Wert
ACTN4	11,551 ± 0,742	11,005 ± 0,468	11,317 ± 0,619	11,423 ± 0,653	11,730 ± 0,715	10,439 ± 0,824	0,0254*
ARHGAP31	9,164 ± 0,969	8,461 ± 0,801	8,197 ± 0,638	9,517 ± 0,754	7,018 ± 0,888	7,309 ± 0,581	<2e-16*
CD9	8,972 ± 1,288	9,095 ± 1,163	9,382 ± 2,422	9,105 ± 1,209	10,944 ± 1,522	10,674 ± 0,765	3,4e-07*
CDK4	9,416 ± 0,474	9,395 ± 0,525	9,157 ± 0,586	10,201 ± 0,513	9,365 ± 0,695	8,531 ± 0,552	1,3e-09*
CSRN P1	4,562 ± 0,286	4,476 ± 0,344	4,126 ± 0,227	4,683 ± 0,425	4,600 ± 0,400	4,363 ± 0,382	0,0064*
EEF2	17,412 ± 0,350	17,415 ± 0,313	17,309 ± 0,247	17,738 ± 0,339	17,462 ± 0,392	17,017 ± 0,334	0,0003*
EPSTI1	9,058 ± 0,480	9,125 ± 0,580	9,032 ± 1,004	10,008 ± 0,721	9,459 ± 1,389	9,289 ± 1,663	0,0128*
FAIM	6,840 ± 0,359	7,091 ± 0,672	7,164 ± 0,400	7,406 ± 0,497	6,431 ± 0,525	6,656 ± 0,477	8,2e-10*
FEN1	6,389 ± 0,590	6,561 ± 0,341	6,972 ± 0,401	6,594 ± 0,456	6,807 ± 0,811	6,736 ± 0,486	0,0082*
HEATR3	8,732 ± 0,386	8,446 ± 0,421	8,896 ± 0,145	8,127 ± 0,704	8,777 ± 0,414	9,220 ± 0,462	2,3e-05*
MIF	9,250 ± 0,557	9,285 ± 0,434	8,719 ± 0,746	9,645 ± 0,604	9,415 ± 0,745	8,796 ± 0,401	0,0003*
MLX	7,442 ± 0,613	7,195 ± 0,499	7,218 ± 0,380	7,769 ± 0,568	7,058 ± 0,593	6,457 ± 0,555	3,1e-06*
MRPS36	7,050 ± 0,355	6,740 ± 0,295	7,173 ± 0,341	7,446 ± 0,549	7,072 ± 0,658	6,361 ± 0,651	2,1e-05*
NDUFA11	9,793 ± 0,575	9,648 ± 0,467	9,704 ± 0,837	10,248 ± 0,648	9,899 ± 0,677	8,817 ± 0,707	0,0002*
PACS1	7,024 ± 0,493	7,067 ± 0,352	6,756 ± 0,603	6,546 ± 0,678	7,063 ± 0,477	7,107 ± 0,407	0,0014*
PEA15	11,785 ± 0,487	11,763 ± 0,620	11,236 ± 0,810	12,430 ± 0,469	11,023 ± 0,727	11,225 ± 0,929	9,3e-13*
PNPLA6	9,863 ± 0,782	9,479 ± 1,032	8,825 ± 1,141	8,912 ± 0,850	9,043 ± 0,995	8,479 ± 0,714	0,0026*
PPIB	16,499 ± 0,592	16,417 ± 0,407	16,380 ± 0,911	15,864 ± 0,574	16,442 ± 0,998	16,056 ± 0,919	0,0077*
PRMT1	11,721 ± 0,544	11,772 ± 0,628	11,614 ± 0,763	12,125 ± 0,521	11,539 ± 0,601	11,425 ± 0,683	0,0081*
RAP2B	7,575 ± 0,812	7,129 ± 0,541	7,533 ± 0,506	7,726 ± 0,678	7,202 ± 0,720	6,765 ± 0,332	0,0069*
RPS29	17,333 ± 0,598	17,046 ± 0,488	16,768 ± 0,907	18,159 ± 0,665	17,362 ± 0,528	15,904 ± 0,458	2,2e-12*
SPATA2	6,473 ± 0,371	6,443 ± 0,386	6,197 ± 0,283	6,411 ± 0,367	6,472 ± 0,300	5,976 ± 0,563	0,0314*
TCEAL3	4,284 ± 0,193	4,327 ± 0,238	4,313 ± 0,132	4,445 ± 0,237	4,193 ± 0,225	4,262 ± 0,220	0,0090*
TMOD2	7,572 ± 0,607	7,515 ± 0,461	7,521 ± 0,582	8,339 ± 0,664	7,259 ± 0,712	6,854 ± 0,449	1,3e-07*
TRAF1	5,360 ± 0,410	5,084 ± 0,515	5,038 ± 0,414	4,612 ± 0,603	4,595 ± 0,500	4,637 ± 0,364	5,3e-07*
TUBB6	6,839 ± 0,482	6,653 ± 0,495	6,979 ± 0,608	7,757 ± 0,763	7,166 ± 0,577	7,070 ± 0,486	6,3e-08*
UBE2D1	12,055 ± 0,533	12,122 ± 0,540	12,019 ± 0,524	12,478 ± 0,626	12,419 ± 0,636	11,820 ± 0,297	0,0031*
VIM	14,649 ± 0,679	14,637 ± 0,474	14,318 ± 0,546	14,903 ± 0,513	14,136 ± 0,855	13,746 ± 0,505	0,0083*
ZDHHC3	10,479 ± 0,422	10,396 ± 0,310	10,205 ± 0,240	10,617 ± 0,400	10,656 ± 0,422	9,938 ± 0,470	0,0009*
ZFYVE27	8,030 ± 0,380	8,104 ± 0,540	7,738 ± 0,503	7,595 ± 0,550	7,653 ± 0,408	7,793 ± 0,284	0,0260*
ZNF511	7,016 ± 0,473	7,045 ± 0,595	6,745 ± 0,335	7,583 ± 0,485	6,868 ± 0,470	6,625 ± 0,706	6,0e-05*
ZNF526	8,258 ± 0,347	8,176 ± 0,379	7,704 ± 0,401	8,279 ± 0,357	8,093 ± 0,594	7,318 ± 0,993	1,3e-05*

Die Tukey-biweight Mittelwerte und Standardabweichungen (MW ± SD) der log2 Signalwerte der 32 priorisierten Zieltranskripte von hsa-mir-199a-1, für die eine signifikante (* p < 0,05) differentielle Expression zwischen den Kohorten festgestellt werden konnte, sind dargestellt. Die niedrigsten (blau) und höchsten Werte (gelb) sind hervorgehoben. IRT = Immunrekonstituierende Therapien; PPMS = Primär progrediente MS; RRMS = Schubförmig remittierende MS.

13. DANKSAGUNG

14. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock,

31.05.2021

Datum

Nina Boxberger

15. LEBENSLAUF
